蛋白质和酶学研究方法

第一册

鲁子贤 主编

科学出版社

第 一 集

[illegible]

[illegible]

58.1742
777

蛋白质和酶学研究方法

第一册

鲁子贤 主编

中国科学院
图书馆藏
中科院植物所图书馆
S0011916

科学出版社
1989

24916

内 容 简 介

本书着重介绍生化实验室中常用的各种蛋白质和酶学研究方法，目的在于读完相应章节后即可在实验室中进行具体操作。第一册的内容主要包括制备及分析蛋白质的一部分最基本方法，例如在溶液中蛋白质浓度的测定、盐析、结晶、透析、超滤、分离、序列测定等等。可供生物化学研究人员和实验室工作者、大专院校有关专业的师生参考。

蛋白质和酶学研究方法

第一册

鲁子贤 主编

责任编辑 赵甘泉

科学出版社 出版

北京朝阳门内大街 137 号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行　各地新华书店经售

*

1989年 4 月第 一 版　开本：787×1092 1/16

1989年 4 月第一次印刷　印张：9 1/2

印数：0001—8,240　字数：218,000

ISBN 7-03-000885-5/Q·140

定价： 5.20 元

24310

序　言

作为生物化学和分子生物学研究的重要对象——蛋白质，对它的研究经久不衰，研究方法不断有所创新。酶是最重要的一类蛋白质，虽有一些特殊的研究方法，但多数方法与蛋白质的是一样的。由于这些方法是生物学许多实验室日常的需要，因此我们应科学出版社之邀，组织富有实践经验的人员撰写。我们也欢迎国内有实践经验的同行来联系，参加今后各分册有关章节的撰写。

顾名思义，本书着眼于方法的应用。我们的原则是各章可大可小，在简单地阐述基本原理后，着重描述各种实验的具体操作。但是我们不希望用一种简单的模式来束缚各作者的写作风格，因此写作的模式在同一分册中并不完全一样。我们想，读者可能会欢迎这种格局的。

以往的经验是同类题目完成写作的时间很难同步。我们采用先完成先编入分册出版的方法，来克服这一困难，但各分册的内容也因此而显得零乱。我们希望有机会将本书出第二版。在那时，我们将根据方法的性质来编排分册，以利于读者使用。

《蛋白质和酶学研究方法》主编

许根俊　林其谁　鲁子贤

1988年于中国科学院
上海生物化学研究所

目　录

溶液中蛋白质浓度的测定……………………………………………………………吴如丹（1）
蛋白质的盐析法………………………………………………………虞荣华　鲁子贤（8）
酶或蛋白质的结晶…………………………………………………………………吴克佐（17）
透析…………………………………………………………………………………冯佑民（29）
糖蛋白中糖含量的测定……………………………………………………………王克夷（37）
蛋白质的水解………………………………………………………………………林南琴（40）
超滤法及其应用……………………………………………………………………夏其昌（42）
离子交换层析………………………………………………………………………陈远聪（53）
疏水层析……………………………………………………………………………屈贤铭（61）
蛋白质亲和层析技术………………………………………………………………王克夷（66）
亲和层析用于糖蛋白的分离………………………………………………………王克夷（73）
高效液相色谱在蛋白质和酶学中的应用…………………………………………夏其昌（77）
Edman 降解法测定蛋白质序列……………………………………………………林南琴（99）
4-N,N-二甲胺基偶氮苯-4′-异硫氰酸酯（DABITC）蛋白质微量序列分析………
……………………………………………………………………………………钱瑞卿（108）
超离心分析法测定分子量………………………………………………许秋萍　程伊洪（116）
从蛋白质的一级结构预测二级结构………………………………………………张　鹰（131）

溶液中蛋白质浓度的测定

吴 如 丹

（中国科学院上海生物化学研究所）

溶液中蛋白质的浓度可根据它们的物理化学性质，如折射率、比重、紫外光吸收来测定；可用化学反应方法，如克氏定氮、双缩脲反应、福林-酚反应测定；也可用染色法，如氨基黑、考马斯亮蓝测定；此外还可用萤光激发、氯胺 T、放射性同位素计数等灵敏度较高的方法[1-4]。上述方法中，紫外吸收法、双缩脲法、福林-酚试剂法、考马斯亮蓝染色法最为常用，它们操作简单，不需要昂贵的设备。以下主要介绍这几种方法。

一、紫外吸收法

1. 280nm 光吸收法[5,6]

由于蛋白质中酪氨酸和色氨酸残基的苯环含有共轭双键，因此蛋白质溶液在 275nm—280nm 处有一个紫外吸收高峰，在一定浓度范围内，蛋白质溶液在 280nm 的光吸收值（简写作 A_{280}）与其浓度成正比，因此可作定量测定，该法测定范围为 0.1—1.0mg 蛋白质/ml 溶液。

该测定方法简单、灵敏、快速、不消耗样品，低浓度的盐类不干扰测定，因此在蛋白质和酶的生化制备中广泛应用，特别是在柱层析分离中，常利用 A_{280} 进行紫外检测，来判断蛋白质洗脱的情况。

由于不同蛋白质中酪氨酸和色氨酸的含量不同、所处的微环境也不同，因此不同蛋白质溶液在280nm 的光吸收值也有不同。据初步统计，浓度为 1mg/ml 溶液的 1800 种蛋白质及蛋白质亚基在 280nm 的光吸收值在 0.3—3.0 之间[7]，平均值为 1.25±0.51。

（1）测定方法 取 3 毫升蛋白质溶液，以缓冲液作为对照，用光径为 1cm 的石英比色杯，在 280nm 测光吸收值。通常以浓度为 1mg 蛋白质/ml 溶液的 A_{280} 为 1.0 作为估算。若已知该蛋白质的文献值[7]，可直接计算出样品溶液中蛋白质的浓度。

该方法适用于一般的半定量测定，也可用于纯蛋白质的定量测定。由于蛋白质的紫外吸收高峰常因 pH 值的改变而有变化，故用紫外吸收法时要注意溶液的 pH 值。

2. 280nm 和 260nm 的吸收差法[5,8]

若样品中含有嘌呤、嘧啶等核酸类吸收紫外光的物质，在用 A_{280} 来测定蛋白质浓度时，会有较大的干扰。由于核酸在 260nm 的光吸收比 280nm 更强，因此可利用 280nm 及 260nm 的吸收差来计算蛋白质的浓度。常用下列经验公式估算：

$$蛋白质浓度(mg/ml) = 1.45A_{280} - 0.74A_{260}$$

（假设 1mg 蛋白质/ml 溶液的 A_{280} 为 1.0）。

3. 215nm 和 225nm 的吸收差法[9,10]

蛋白质的肽键在 200nm—250nm 有强的紫外光吸收，其光吸收强弱在一定范围与浓度成正比，且波长越短光吸收越强，若选取 215nm 可减少干扰及光散射，用 215nm 和 225nm 光吸收差值与单一波长测定相比可减少非蛋白质成分引起的误差。因此，对稀溶液中蛋白质浓度测定可用 215nm 和 225nm 光吸收差法，常用下列经验公式：蛋白质浓度（mg/ml）= 0.144(A_{215}—A_{225})，测定范围为 20—100μg 蛋白质/ml。

该方法测定灵敏度高，且不同蛋白质之间差异较小。氯化钠、硫酸铵以及 0.1mol/L 磷酸、硼酸和 Tris 等缓冲液都无显著干扰。但是，0.1mol/L 的氢氧化钠、乙酸、柠檬酸、琥珀酸、邻苯二甲酸、巴比妥等缓冲液在 215nm 的光吸收较大，必须降至 5mmol/L 才无明显干扰。

二、双缩脲法

（一）常量双缩脲法[11]

蛋白质含有多个肽键，因此有双缩脲反应，在碱性溶液中蛋白质与铜离子形成紫红色化合物，可在 540nm 比色测定，其颜色深浅与蛋白质浓度成正比，而与蛋白质的分子量及氨基酸组成无关，该法测定范围为 1—10mg 蛋白质/ml。

双缩脲法最常用于需要快速的测定，硫酸铵不干扰此显色反应，使其有利于对蛋白质纯化早期步骤的测定。干扰此测定的物质有 Tris 及含氨基酸、多肽的缓冲液，以及蔗糖、甘油等。

1. 测定方法

（1）溶液配制

蛋白质标准溶液　准确称取经真空干燥的标准蛋白质（常用牛血清白蛋白），用水配制成 10mg/ml 的溶液（可用 1mg 牛血清白蛋白/ml 的 A_{280} 为 0.66 来校正）[6]。如果蛋白质不易溶解，可用 0.05mol/L 氢氧化钠溶液配制，也可加热或放置过夜以助溶。

双缩脲试剂　称取 1.5g 硫酸铜（$CuSO_4 \cdot 5H_2O$）、6g 酒石酸钾钠（$NaKC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$），依次溶解于 500ml 水中，在搅拌下加入 300ml 10%氢氧化钠溶液，用水稀释到 1l。通常可加入 1g 碘化钾以防止铜离子自动还原形成一价氧化铜沉淀。所用的蒸馏水应煮沸以逐出所溶解的二氧化碳，待冷却后配制。配好的双缩脲试剂应贮存于塑料瓶中（或内壁涂以石蜡的瓶中）。此试剂可长期保存，若瓶中有黑色沉淀出现则需重配。

（2）标准曲线

0 1 2 4 6 8 10

在试管中分别加入 0、0.06、0.12、0.24、0.36、0.48、0.60ml 标准蛋白质溶液，用水补足到 0.60ml，然后各加 2.4ml 双缩脲试剂，混匀后在室温（20—25℃）保温 15 分钟，然后在 540nm 比色测定。以溶液中蛋白质浓度为横坐标，A_{540} 为纵坐标作标准曲线。5mg 牛血清白蛋白/ml 溶液的 A_{540} 约为 0.27。该方法标准曲线的线性及重复性较好，一般每配一次溶液作一次标准曲线即可。

取 0.6ml 未知浓度的样品同上测 A_{540}，然后从标准曲线上查得其浓度，注意样品浓度若超过 10mg/ml 时，应作适当稀释。若样品中脂类等含量过高，在 30 分钟后会有雾状沉淀产生，故须注意控制在 30 分钟内比色完毕。

（二）微量双缩脲法[12]

该法显色原理与双缩脲法相同，由于铜与蛋白质复合物的最大吸收峰在 260—280 nm，但在此区域干扰因素及空白的吸收都很大，而在 310—330nm 测定，干扰因素少一些，但仍比 540nm 测定灵敏 10 倍以上，因此可选用 310nm 进行比色测定，测定范围为 0.1—1.0mg 蛋白质/ml；或用 330nm 测定，测定范围为 0.2—2.0mg 蛋白质/ml。

干扰此测定的物质包括组氨酸、丝氨酸、苏氨酸、Tris、乙醇胺、葡萄糖、多肽、硫酸铵、尿素、去垢剂等。

1. 测定方法

（1）溶液配制

标准蛋白质溶液　1.0 或 2.0mg 牛血清白蛋白/ml。

微量双缩脲试剂　称取 173g 柠檬酸三钠（$Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$）、100g 无水碳酸钠（$Na_2CO_3$）一齐溶解于温水中，称取 17.3g 硫酸铜（$CuSO_4 \cdot 5H_2O$）溶于 100ml 水中，两者合并用水稀释至 1升。该试剂可长期保存。出现黑色沉淀需重配。

6% 氢氧化钠溶液。

（2）作标准曲线

在试管中分别加 0、0.15、0.3、0.6、0.9、1.2、1.5ml 标准蛋白质溶液，用水补足到 1.5ml，加 1.5ml6%氢氧化钠溶液混匀，再加 0.15ml 微量双缩脲试剂，混匀后在室温(20—25℃)保温 15 分钟，然后在 310nm 或330nm 比色测定，作标准曲线。1.0mg 牛血清白蛋白/ml 溶液的 A_{310} 约为 1.04，A_{330} 约为 0.67。

取 1.5ml 未知浓度的样品同上测定，然后从标准曲线上查得其浓度。

三、福林-酚试剂法[13]

这方法是双缩脲法的发展，首先在碱性溶液中形成铜与蛋白质复合物，然后这个复合物以及酪氨酸和色氨酸残基还原磷钼酸-磷钨酸试剂(福林试剂)，产生深蓝色。这个测定法比双缩脲法灵敏，但要花费较长时间。此法也适用于酪氨酸和色氨酸的定量测定，对那些含这两个残基与标准蛋白质差异较大的蛋白质有误差。进行测定时，加福林试剂要特别小心，因为福林试剂仅在酸性条件下稳定，但上述还原反应只是在 pH10 的情况下发生，因此当福林试剂加到碱性的铜与蛋白质溶液中必须立刻混匀，以便在福林试剂被破坏之前，还原反应即能发生。该法可用 750nm 比色测定，范围为 0.03—0.3mg 蛋白质/ml；或 500nm 比色测定，范围为 0.05—0.5mg 蛋白质/ml。该法标准曲线线性较差，样品浓度需按标准曲线校正。

由于福林-酚试剂法使用很广泛，对其干扰因素了解得最多。已知的干扰因素包括

Tris、HEPES、PIPES、MOPS、MES、CAPS、TES、CHES、柠檬酸、琥珀酸、谷氨酸、组氨酸、甘氨酸、N-二(羟乙基)甘氨酸、甘氨酰甘氨酸等缓冲液;EDTA、EGTA 等螯合剂;蔗糖、甘油、氨基葡萄糖、果糖、甘露糖、鼠李糖、木糖、山梨醇等糖类;酚、二巯基苏糖醇、巯基乙醇、谷胱甘肽、半胱氨酸等还原剂;汞、锰、钴等二价金属离子;Triton、Tween、Lubrol 等去垢剂,以及乙烯、乙二醇、聚乙烯、吡咯烷酮、载体两性电解质等等。高浓度的尿素、胍、硫酸铵、硫酸钠、硝酸钠、钾盐、三氯乙酸、乙醇、乙醚、丙酮、脂类等化合物也对测定有影响[1,2,3,4,14]。

1. 测定方法

(1) 溶液配制

标准蛋白质溶液　　0.3 或 0.5mg 牛血清白蛋白/ml。

福林-酚试剂

试剂甲:由下述 3 种溶液配制:(1) 称取 20g 无水碳酸钠、4g 氢氧化钠溶解于 1 升水中;(2) 称取 0.2g 硫酸铜溶于 20ml 水;(3) 称取 0.4g 酒石酸钾钠溶于 20ml 水。在测定的当天将这三种溶液按 100:1:1 的体积比混合,即为福林-酚试剂甲,混合后放 30 分钟后使用,混合液只能用一天。三种溶液分开可长期保存。

试剂乙(福林试剂):试剂乙市上有售,上海医学化验所生产的名为"酚试剂"。自己配制时,在 2升 的磨口回流装置内加入 100g 钨酸钠 ($Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$),25g 钼酸钠 ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$),700ml 蒸馏水,再加 50ml 85% 磷酸及 100ml 浓盐酸,充分混匀后,以小火回流 10 小时,再加入 150g 硫酸锂 ($LiSO_4$),50ml 蒸馏水及数滴液体溴,然后开口继续沸腾 15 分钟,以便驱除过量的溴,冷却后定容到 1 升,过滤,溶液呈黄绿色,置于棕色试剂瓶中冰箱保存。使用时将购买的或自制的试剂乙用标准氢氧化钠溶液滴定,以酚酞为指示剂,而后用水适量稀释(约 2.3 倍),使酸度最后为 1mol/L,此为福林酚试剂乙,贮于冰箱中可长期保存。

(2) 作标准曲线

在试管中分别加入 0、0.025、0.05、0.075、0.10、0.15、0.20、0.25、0.30、0.35、0.40、0.45、0.50ml 标准蛋白质溶液,用水补足到 0.50ml,加 2.5ml 当天配制的试剂甲,混匀后在室温(20—25℃)放 10 分钟,再加入 0.25ml 试剂乙,立即混匀,室温放 30 分钟,然后在 500nm 或 750nm 比色测定,作标准曲线。该法显色受时间与温度影响较大,要注意控制在同一条件下进行。0.2mg 牛血清白蛋白/ml 溶液的 A_{500} 约为 0.33,A_{750} 约为 0.56。

2. 膜蛋白质的测定与改进的福林-酚试剂法

在对膜制剂(如红细胞膜、线粒体膜等)上的蛋白质含量进行测定时,由于膜制剂不溶于水,悬浮液有光散射现象,因此不能用紫外光吸收法测定;在用去垢剂增溶膜蛋白的溶液中,有些非离子型去垢剂(如 Triton X-100)在 280nm 有强烈的光吸收[15],也妨碍了紫外光吸收法的测定。

由于膜蛋白质的氨基酸组成与一般水溶性蛋白质差异不大,虽然非极性氨基酸所占比例略高,但色氨酸和酪氨酸残基与一般蛋白质相近,因此,用双缩脲和福林法均可直接测定膜蛋白质的浓度[14,16,17]。对膜制剂也可先在 3% 脱氧胆酸钠溶液中放 10 分钟,使膜

溶解后再加双缩脲试剂测定[4]。

有些生物膜样品所含的脂类较多(大于1%),或膜蛋白质的增溶溶液中去垢剂(Triton、Tween、Lubrol 等)含量较高(大于 0.05%),在用福林法测定时会与试剂显色或形成复合物沉淀影响测定,这时可对膜样品作下述处理:

(1) 生物膜悬浮液或增溶后的膜蛋白质溶液与等体积的 0.5mol/L 氢氧化钠和 4% 脱氧胆酸钠(或 10% SDS)溶液混合后保温 10 分钟,使膜蛋白质充分溶解后用福林法测定,脱氧胆酸钠或 SDS 本身不干扰显色反应,其存在可防止复合物的形成与沉淀[16]。

(2) 在试剂甲中加入九分之一体积的 10% SDS 溶液,混匀,使 SDS 在试剂甲中的最终浓度为 1%,然后用福林法直接对膜样品测定[14]。

(3) 若去垢剂或脂类浓度过高,可在 0.5 毫升蛋白质样品液中加 50μl 1% 的脱氧胆酸钠溶液混匀,再加入1ml 10% 的三氯乙酸溶液,使蛋白质充分沉淀,在每分钟 3000 转离心 5 分钟或用每分钟 1 万转以上的 Eppendorf 离心机离心 1 分钟,吸去上清液,注意残留的溶液必须小于 50μl,沉淀用含 1% SDS 的试剂甲直接溶解后测定(若不易溶解可放置数小时或适当加热促使其溶解)。这一方法还可用于稀蛋白质溶液浓缩后测定(含 0.02% 脱氧胆酸钠及 6—15% 三氯乙酸),以及溶液中有各种干扰物质时的测定。许多干扰物质经一次沉淀就可以消除干扰影响,但有些物质(如 0.03mol/L Tris-盐酸、0.015% 乙酰丙酮、0.015% 酚类等)需二次沉淀[2,14]。

溶液配制

10% 或 50% 的三氯乙酸配制后可长期保存。

1% 或 4% 脱氧胆酸钠溶液需新鲜配制或配后在冰箱中冰冻保存。若有胶状物出现应重配。

10% SDS 溶液可长期保存。市售的 SDS 若纯度不高或溶解不好时,可用乙醇重结晶后使用。1% SDS 也可配制在福林酚试剂甲(1)(即碳酸钠-氢氧化钠)溶液中长期保存。在天冷时 SDS 往往从溶液中结晶析出,可在温水浴中溶解后使用。

在用以上改进的福林法测定时,要注意对照及标准曲线的制作应与样品在同一条件下进行。

四、考马斯亮蓝 G-250 染色法[1,18]

考马斯亮蓝 G-250 在酸性溶液中为棕红色,当它与蛋白质通过疏水作用结合后,变为蓝色,可在 595nm 比色测定。该法反应快、操作简便,消耗样品量少,但不同蛋白质之间差异较大,且标准曲线线性较差。测定范围为 0.01—1.0mg 蛋白质/ml。

高浓度的 Tris、EDTA、尿素、甘油、蔗糖、丙酮、硫酸铵、去垢剂对测定有干扰,缓冲液浓度过高改变测定液 pH 会影响显色。考马斯亮蓝染色能力很强,比色杯不洗干净会影响光吸收值,注意不可使用石英比色杯[4]。

(一) 测 定 方 法

(1) 溶液配制

标准蛋白质溶液　0.1 或 1.0mg 牛血清白蛋白/ml。

染色液　称取100mg考马斯亮蓝G-250溶解于50ml 95%乙醇中，加100ml 85%的磷酸，加水稀释到1升。该染色液可保存数月，若不加水可长期保存，临用前再稀释。

作标准曲线　在试管中分别加0、6、12、24、36、48、60μl标准蛋白质溶液，用水补足到60μl，加3ml染色液，混匀后在室温(20—25℃)保温15分钟，在595nm比色测定，作标准曲线。该法标准曲线线性较差，要注意校正；且显色受时间与温度影响较大，要注意控制在同一条件下进行。0.5mg牛血清白蛋白/ml溶液的 A_{595} 约为0.50。

取60μl未知浓度的样品溶液同上测定，然后从标准曲线上查得其浓度。

当样品中蛋白质浓度较稀时(0.01～0.1mg/ml)，可在3ml染色液中加0.3ml样品溶液，同时作标准曲线，测595nm的光吸收值。0.05mg牛血清白蛋白/ml溶液的 A_{595} 约为0.29。

附表　不同方法测蛋白质浓度的比较

方法	测定范围(μg/ml)	需要样品体积(ml)	需要样品量(μg)	不同蛋白质之间差异	仪器设备及其他
A_{280}	100～1000	3	300～3000	大	紫外分光光度计，测 A_{280}，样品可回收
$A_{215-225}$	20～100	3	60～300	小	紫外分光光度计，测 A_{215}、A_{225}，样品可回收
双缩脲	1000～10000	0.6	600～6000	小	可见分光光度计，测 A_{540}
微量双缩脲	100～2000	1.5	150～3000	小	紫外分光光度计，测 A_{310} 或 A_{330}
福林-酚	30～500	0.5	15～250	大	可见分光光度计，测 A_{500} 或 A_{750}
氨基黑[19]	10～500	0.2	2～100	大	可见分光光度计 测 A_{620} 需过滤，色转移
四溴酚酞磺酸钠[20]	10～5000	小于0.3	3～600	大	可见分光光度计，测 A_{580} 需过滤，色转移
考马斯亮蓝R-250[21]	100～1000	小于0.06	6～60	小	可见分光光度计，测 A_{590} 需过滤，色转移
考马斯亮蓝G-250	10～1000	0.06或0.3	3～60	大	可见分光光度计，测 A_{595} 需过滤，色转移
荧光胺*[22]	2～200	0.25	0.5～50	小	萤光分光光度计，395nm激发，475nm发射
氯胺丁[23]	0.07～0.7	小于0.3	0.02～0.2	大	可见分光光度计，测 A_{410} 小型柱凝胶过滤
丹磺酰氯*[24]	1～100	0.05	0.05～5	大	同位素放射计数仪
克氏定氮*[25,26]			大于300	小	微量克氏定氮仪全套
克氏定氮-*茚三酮[27]	200～1000	0.4	80～400	小	消化瓶，可见分光光度计，测 A_{570}

注：除*外，各方法均按3ml左右溶液比色测定计算，比色杯光径为1cm，若使用1ml体积的比色杯可将样品及试剂的量作相应减少。

参 考 文 献

[1] Thorne, C. J. R., Techniques in Protein and Enzyme Biochemistry, B104, (1978) Elsevier/North-Holland.
[2] 蔡武城、袁厚积,«生物物质常用化学分析法», 89 页, 1982, 科学出版社.
[3] 张龙翔等,«生化实验方法和技术», 164 页, 1981, 人民教育出版社.
[4] Peterson, G. L., Methods in Enzymology, **91**, 95. (1983).
[5] Warburg, O. et al., *Biochem. Z.*, **310**, 384, (1941). **303**, 40, (1939).
[6] Layne, E., Methods in Enzymology, **3**, 447, (1957).
[7] Kirschembaum, D. M., *Int. J. Protein Res.*, **3**, 109, 157, 237, 329, (1971). **4**, 63, (1972). *Int. J. Peptide Protein Res.*, **4**, 125, (1972). **5**, 49, (1973). *Anal. Biochem.*, **55**, 166. **56**, 237, (1973). 64, 186,. **68**, 465, (1975). **80**, 193. **81**, 220. **82**, 83, (1977).
[8] Kalckar, H. M., *J. Biol. Chem.*, **196**, 461, (1947).
[9] Waddell, W. J., *J. Lab. Clin. Med.*, **48**, 311, (1956).
[10] Murphy, J. B. & Kies, M. W., *Biochim. Biophys. Acta*, **45**, 382, (1960).
[11] Gornall, A. C. et al., *J. Biol. Chem.*, **177**, 751, (1949).
[12] Goa, J., *J. Clin. Lab. Invest.*, **5**, 218, (1953).
[13] Lowry, O. H. et al., *J. Biol. Chem.*, **193**, 265, (1951).
[14] Bennett, J. P., Techniques in Lipid and Membrane Biochemistry, B408, (1982), Elsevier/North-Holland.
[15] Holloway, P. W., *Anal. Biochem.*, 53, 304, (1973).
[16] Dunn, M. J. & Maddy, A. H., Biochemical Analysis of Membranes, p. 197, (1976), London Chapman and Hall.
[17] Capaldi, R. A. and Vanderlooi, G., *Proc. Nati. Acad. Sci. USA.*, **69**, 930, (1972).
[18] Bramhall, S. et al., *Anal. Biochem.*, **31**, 146, (1969).
[19] Nakao, T. et al., *Anal. Biochem.*, **55**, 358, (1973).
[20] McGuire, J. et al., *Anal. Biochem.*, **83**, 75, (1977).
[21] McKnight, G. S., *Anal. Biochem.*, **78**, 86, (1977).
[22] Bohlen, P. et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, **155**, 213, (1973).
[23] Goldberg, M. L., *Anal. Biochem.*, **51**, 240, (1973).
[24] Schulz, R. M. & Wasserman, P. M., *Anal. Biochem.*, **77**, 25, (1977).
[25] Chibnall, A. C. et al., *Biochem. J.*, **37**, 354, (1943).
[26] Jacob, S. et al., Methods of Biochemical Analysis, **13**, 241, (1965).
[27] Jacob, S., *Nature*, **183**, 262, (1958).

蛋白质的盐析法

虞荣华　　鲁子贤

（中国科学院上海生物化学研究所）

蛋白质的溶解度因溶液中含盐的浓度变化而变化。一般的白蛋白和球状蛋白质在盐浓度高的时候，都因盐浓度的增加而溶解度降低。当盐浓度增加到某一浓度后，蛋白质就从溶液中析出。这种现象称盐析。不同的蛋白质盐析所需盐的浓度不同，因此可以利用这一性质将蛋白质分离(表1)。盐析法是纯化蛋白质最经典的方法之一，但是今天仍是实验室和工厂中纯化蛋白质的重要方法。

表1　血浆蛋白质的盐析

蛋白质	g/100ml 血浆	占血浆总蛋白质的百分率(%)	盐析时所需硫酸铵的饱和度(%)
纤维蛋白原	0.3	4	20
优球蛋白	0.2	3	33
拟球蛋白 I	1.3	17	40
拟球蛋白 II	0.5	7	46
白蛋白	5.2	69	62　70

影响蛋白质盐析行为的首先是蛋白质的性质，其次是盐的性质，溶液中盐的浓度、pH值及温度。

一、硫酸铵盐析

硫酸铵是蛋白质盐析法中最常用的盐。它有几个优点：水中的溶解度大，对绝大多数蛋白质的天然状态没有影响，价格便宜，没有大的公害问题，在饱和的硫酸铵溶液中，几乎所有的蛋白质都能沉淀析出，因此可以盐析几乎所有的蛋白质。

硫酸铵的缺点是：溶解度因溶液温度变化而有较大的变化；该试剂中含有极微量的金属元素，不易纯化。前一缺点在处理浓硫酸铵溶液时会引起一些麻烦，将样品溶液移至冷的环境(如4℃)时，硫酸铵也同时析出。后一缺点在纯化某些活力与金属离子有重要关系的蛋白质时要特别注意。另外，硫酸铵缓冲能力较差，pH 较难控制。

制备蛋白质时，习惯上都以饱和度来表示它的浓度。饱和度（Satn）可以定义为：

$$\text{Satn} = \text{所用溶液的浓度}/\text{饱和溶液的浓度}$$

所以可以用小于 1 的数值，或百分数表示。由于硫酸铵的溶解度因温度变化而有较大变

表 2 硫酸铵饱和度的常用表

(1) 硫酸铵溶液饱和度表(0℃)

始浓度 \ 终浓度	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100	向每1升溶液中加固体硫酸铵的克数
0	106	134	164	194	226	258	291	326	361	398	436	476	516	559	603	650	697	
5	79	108	137	166	197	229	262	296	331	368	405	444	484	526	570	615	662	
10	53	81	109	139	169	200	233	266	301	337	374	412	452	493	536	581	627	
15	26	54	82	111	141	172	204	237	271	306	343	381	420	460	503	547	592	
20	0	27	55	83	113	143	175	207	241	276	312	349	387	427	469	512	557	
25		0	27	56	84	115	146	179	211	245	280	317	355	395	436	478	522	
30			0	28	56	86	117	148	181	214	249	285	323	362	402	445	488	
35				0	28	57	87	118	151	184	218	254	291	329	369	410	453	
40					0	29	58	89	120	153	187	222	258	296	335	376	418	
45						0	29	59	90	123	156	190	226	263	302	342	383	
50							0	30	60	92	125	159	194	230	268	308	348	
55								0	30	61	93	127	161	197	235	273	313	
60									0	31	62	95	129	164	201	231	279	
65										0	31	63	97	132	168	205	244	
70											0	32	65	99	134	171	209	
75												0	32	66	101	137	174	
80													0	33	67	103	139	
85														0	34	68	105	
90															0	34	70	
95																0	35	
100																	0	

化，因此在定义 Satn 的公式中，分母中实际上包含有不同温度下硫酸铵的溶解度，这样，为了使各家实验室间可相互重复，就必须指定盐析时溶液的温度。

表 2 是两种温度下的硫酸铵饱和度表。从表中不仅可找到达某一饱和度时单位体积水中所需加入的硫酸铵的量，还能找到从某一饱和度上升到更高饱和度时所需加入的硫酸铵的量。后一数值很有用，因为蛋白质纯化方法中大多数都是利用硫酸铵来分级，即先加硫酸铵至饱和度 S_1 将出现的沉淀去除后，往清液中加硫酸铵至饱和度 S_2，将沉淀收集。所得沉淀常称为是 S_1—S_2 饱和度级份，个别情况下加至 S_1 后不去沉淀，继续加硫酸铵至 S_2。此时溶液体积中包含了相当体积的沉淀，计算加固体硫酸铵的量时要扣除沉淀的体积。

加固体硫酸铵来纯化蛋白质，用%饱和度方法来计算，有下列不足之处：1. 用%饱和度来表示硫酸铵浓度不如摩尔浓度精确，因为溶液的摩尔浓度不因温度而变，但用%饱和度时即有影响；2. 在一般的文献中往往只有 20—25℃ 的%饱和度表，但是许多蛋白质的

(2) 硫酸铵溶液饱和度表 (25℃)　　　　表 2(续)

始浓度 \ 终浓度	10	20	25	30	33	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	90	100	向每1升溶液中加固体硫酸铵的克数
0	56	114	144	176	196	209	243	277	313	351	390	430	472	516	561	662	767	
10		57	86	118	137	150	183	216	251	288	326	365	406	449	494	592	694	
20			29	59	78	91	123	155	189	225	262	300	340	382	424	520	619	
25				30	49	61	93	125	158	193	230	267	307	348	390	485	583	
30					19	30	62	94	127	162	198	235	273	314	356	449	546	
33						12	43	74	107	142	177	214	252	292	333	426	522	
35							31	63	94	129	164	200	238	278	319	411	506	
40								31	63	97	132	168	205	245	285	375	469	
45									32	65	99	134	171	210	250	339	431	
50										33	66	101	137	176	214	302	392	
55											33	67	103	141	179	264	353	
60												34	69	105	143	227	314	
65													34	70	107	190	275	
70														35	72	153	237	
75															36	115	198	
80																77	157	
90																	79	

注：始浓度：加固体硫酸铵前溶液的饱和度。
　　终浓度：加固体硫酸铵后溶液的饱和度。

沉淀往往在0℃附近；3. 硫酸铵的比容被假定为常数并等于它饱和时的数值，然而，当硫酸铵的浓度从 0 上升到 3.9mol/L 时（在 0℃ 时饱和硫酸铵溶液是 3.895mol/L），比容从 0.39ml 到 0.53ml/g，在变化着。比容是常数假设在浓硫酸铵溶液中仅仅引起小于 2% 的误差；然而，为得到希望的浓度而加浓硫酸铵溶液的误差可能略大(4% 或更大)。

表 3 给出硫酸铵的重量加到一种溶液中得到所须浓度。表 4 给出加入 3.8mol/L 硫酸铵溶液的体积得到所需的浓度。表 5 和表 6 给出加入固体硫酸铵或 3.8mol/L 硫酸铵溶液后各自的最终体积。

操作注意点：

(1) 可以直接往蛋白质溶液中加固体硫酸铵，但要小量地一点点加，加时要充分搅拌，避免在固体表面出现过浓的硫酸铵而将不该析出的蛋白质析出。为了减轻这一问题，可以用饱和硫酸铵溶液来分级（表 7），表格给出 1 升 溶液中应添加饱和硫酸铵溶液 ml 数，用以生成所需的饱和百分数。混合后体积的变化略去不计。但这种方法引入了水，将溶液稀释，经常会影响蛋白质的产率。

(2) 蛋白质盐析时要考虑到溶液的 pH，将蛋白质溶液 pH 调至等电点附近时，使其溶解度达到最低，这时蛋白质最易析出，产率也最高。

表3　0℃时，加到1升溶液中硫酸铵的克数

%饱和度	终浓度 / 始浓度	0.00	0.20	0.40	0.60	0.80	1.00	1.20	1.40	1.60	1.80	2.00	2.20	2.40	2.60	2.80	3.00	3.20	3.40	3.60	3.80	3.90
0.0	0.00	0.00	26.7	54.0	81.9	111	140	170	202	234	267	302	338	375	413	453	495	539	585	632	682	707
5.1	0.20		0.00	27.0	54.7	83.0	112	142	173	205	238	272	308	344	383	422	464	507	552	599	649	673
10.3	0.40			0.00	27.4	55.4	84.2	114	144	176	209	243	278	314	352	391	432	475	519	566	615	639
15.4	0.60				0.00	27.7	56.2	85.5	116	147	179	213	247	283	321	359	400	442	486	533	581	605
20.5	0.80					0.00	28.1	57.1	87.0	118	150	183	217	252	289	328	368	409	453	499	546	570
25.7	1.00						0.00	28.6	58.1	88.5	120	153	186	221	258	296	335	376	420	465	512	535
30.8	1.20							0.00	29.1	59.1	90.2	122	156	190	226	264	303	343	386	430	477	499
35.9	1.40								0.00	29.6	60.2	91.9	125	159	194	231	270	310	351	395	441	464
41.1	1.60									0.00	30.2	61.4	93.7	127	162	199	236	276	317	360	405	428
46.2	1.80										0.00	30.7	62.6	95.7	130	166	203	242	282	325	369	391
51.3	2.00											0.00	31.3	63.9	97.7	133	170	208	248	290	333	355
56.5	2.20												0.00	32.0	65.2	99.8	136	174	213	254	297	318
61.6	2.40													0.00	32.7	66.7	102	139	178	218	260	281
66.8	2.60														0.00	33.4	68.2	104	142	182	224	244
71.9	2.80															0.00	34.2	69.8	107	146	187	207
77.0	3.00																0.00	35.0	71.5	110	150	169
82.2	3.20																	0.00	35.8	73.2	112	132
87.3	3.40																		0.00	36.7	75.0	94.0
92.4	3.60																			0.00	37.6	56.1
97.6	3.80																				0.00	18.1
100.0	3.90																					0.00

注：始浓度：加固体硫酸铵前溶液的摩尔浓度。
　　终浓度：加固体硫酸铵后溶液的摩尔浓度。

表 4　0℃ 时,向 l 升溶液中加入 3.8mol/L 硫酸铵溶液的 ml 数

始浓度 \ 终浓度	0.00	0.20	0.40	0.60	0.80	1.00	1.20	1.40	1.60	1.80	2.00	2.20	2.40	2.60	2.80	3.00	3.20	3.40
0.00	0.00	55.3	117	185	263	351	452	570	709	875	1077	1330	1655	2088	2693	3600	5111	8134
0.20		0.00	58.4	124	197	281	377	489	621	779	972	1213	1522	1933	2508	3371	4809	7684
0.40			0.00	61.9	132	211	302	408	534	683	866	1094	1387	1777	2322	3140	4503	7228
0.60				0.00	65.9	141	227	327	446	587	760	975	1252	1620	2135	2907	4194	6768
0.80					0.00	70.5	152	246	357	490	652	855	1115	1462	1946	2673	3884	6305
1.00						0.00	75.9	164	268	393	545	735	978	1303	1756	2437	3570	5837
1.20							0.00	82.3	179	295	437	613	840	1143	1565	2199	3255	5366
1.40								0.00	89.7	197	328	492	702	981	1372	1959	2936	4891
1.60									0.00	98.7	219	369	562	819	1179	1718	2616	4412
1.80										0.00	110	247	423	657	984	1475	2294	3931
2.00											0.00	124	282	494	789	1232	1971	3447
2.20												0.00	141	330	593	988	1645	2961
2.40													0.00	165	396	742	1319	2472
2.60														0.00	198	496	991	1981
2.80															0.00	248	662	1489
3.00																0.00	332	994
3.20																	0.00	498
3.40																		0.00

注：终浓度：加 3.8mol/L 硫酸铵后溶液的摩尔浓度。
　　始浓度：加 3.8mol/L 硫酸铵前溶液的摩尔浓度。

表5　0℃时，向1升溶液中加入固体硫酸铵后溶液的体积（ml）

始浓度＼终浓度	0.00	0.20	0.40	0.60	0.80	1.00	1.20	1.40	1.60	1.80	2.00	2.20	2.40	2.60	2.80	3.00	3.20	3.40	3.60	3.80	3.90
0.00	1000	1010	1021	1033	1046	1060	1074	1090	1106	1123	1142	1161	1181	1203	1225	1249	1275	1301	1329	1359	1373
0.20		1000	1011	1023	1035	1049	1063	1079	1095	1112	1130	1149	1169	1191	1213	1237	1262	1288	1316	1345	1359
0.40			1000	1012	1024	1037	1052	1067	1083	1100	1118	1137	1157	1178	1200	1223	1248	1274	1301	1330	1344
0.60				1000	1012	1025	1039	1054	1070	1087	1105	1124	1143	1164	1186	1209	1233	1259	1286	1315	1329
0.80					1000	1013	1027	1042	1057	1074	1091	1110	1129	1150	1172	1194	1218	1244	1271	1299	1313
1.00						1000	1014	1028	1044	1060	1077	1096	1115	1135	1156	1179	1203	1228	1254	1282	1296
1.20							1000	1014	1030	1046	1063	1081	1100	1120	1141	1163	1187	1211	1237	1265	1278
1.40								1000	1015	1031	1048	1065	1084	1104	1125	1147	1170	1194	1220	1247	1260
1.60									1000	1016	1032	1050	1068	1088	1108	1130	1152	1176	1202	1228	1242
1.80										1000	1016	1033	1052	1071	1091	1112	1135	1158	1183	1209	1222
2.00											1000	1017	1035	1054	1073	1094	1116	1140	1164	1190	1203
2.20												1000	1018	1036	1056	1076	1098	1121	1145	1170	1183
2.40													1000	1018	1037	1058	1079	1101	1125	1150	1162
2.60														1000	1019	1039	1060	1082	1105	1129	1142
2.80															1000	1019	1040	1062	1085	1109	1121
3.00																1000	1020	1041	1064	1087	1099
3.20																	1000	1021	1043	1066	1077
3.40																		1000	1022	1044	1055
3.60																			1000	1022	1033
3.80																				1000	1011
3.90																					1000

注：终浓度：加固体硫酸铵后溶液的摩尔浓度。
始浓度：加固体硫酸铵前溶液的摩尔浓度。

表 6　0℃时，向 1 升溶液中加入 3.8mol/L 硫酸铵溶液后的溶液的总体积（ml）

始浓度 \ 终浓度	0.00	0.20	0.40	0.60	0.80	1.00	1.20	1.40	1.60	1.80	2.00	2.20	2.40	2.60	2.80	3.00	3.20	3.40
0.00	1000	1051	1109	1174	1248	1333	1432	1547	1683	1847	2047	2298	2621	3051	3654	4560	6070	9091
0.20		1000	1055	1117	1187	1268	1362	1471	1601	1757	1947	2186	2493	2902	3476	4337	5773	8646
0.40			1000	1059	1126	1202	1291	1394	1517	1665	1846	2072	2363	2751	3294	4111	5472	8196
0.60				1000	1063	1135	1219	1317	1433	1573	1743	1957	2232	2598	3112	3883	5168	7741
0.80					1000	1068	1147	1239	1348	1479	1640	1841	2099	2444	2927	3652	4862	7282
1.00						1000	1074	1160	1262	1385	1535	1723	1966	2289	2741	3420	4552	6818
1.20							1000	1080	1176	1290	1430	1605	1831	2131	2553	3185	4240	6350
1.40								1000	1088	1194	1324	1486	1694	1973	2363	2948	3924	5878
1.60									1000	1097	1216	1365	1557	1813	2171	2709	3606	5402
1.80										1000	1108	1244	1419	1652	1979	2469	3287	4922
2.00											1000	1122	1280	1491	1785	2227	2965	4441
2.20												1000	1141	1328	1590	1984	2642	3956
2.40													1000	1164	1394	1740	2316	3469
2.60														1000	1198	1494	1989	2979
2.80															1000	1248	1661	2488
3.00																1000	1331	1994
3.20																	1000	1498
3.40																		1000

注：终浓度：加 3.8mol/L 硫酸铵后溶液的摩尔浓度。
　　始浓度：加 3.8mol/L 硫酸铵前溶液的摩尔浓度。

表 7　用饱和硫酸铵溶液分级

所需硫酸铵的最终浓度(饱和百分数)	硫酸铵制备中的初始浓度(饱和百分数)																	
	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85
5	52.6																	
10	111	55.8																
15	177	118	58.8															
20	250	188	125	62.5														
25	333	267	200	133	66.7													
30	429	357	286	214	143	71.4												
35	559	462	385	308	231	154	76.9											
40	667	583	500	417	333	250	167	83.3										
45	818	727	637	546	455	364	273	182	91.0									
50	1000	900	800	700	600	500	400	300	200	100								
55	1222	1111	1000	889	778	667	556	444	333	222	111							
60	1500	1375	1250	1125	1000	875	750	625	500	375	250	125						
65	1857	1714	1571	1429	1286	1143	1000	857	714	571	429	286	143					
70	2333	2167	2001	1833	1667	1500	1333	1167	1000	833	667	500	333	167				
75	3000	2800	2600	2400	2200	2000	1800	1600	1400	1200	1000	800	600	400	200			
80	4000	3750	3500	3250	3000	2750	2500	2250	2000	1750	1500	1250	1000	750	500	250		
85	5667	5333	5000	4667	4333	4000	3667	3333	3000	2667	2333	2000	1667	1333	1000	667	333	
90	9000	8500	8000	7500	7000	6500	6000	5500	5000	4500	4000	3500	3000	2500	2000	1500	1000	500

(3) 温度对饱和硫酸铵溶液也有影响(表 8)。从表中可以看出，0℃ 和 25℃ 时1000 ml 水用硫酸铵饱和所需克数分别为 706.8 和 766.8g。当蛋白质溶液在 25℃ 加入固体硫酸铵达到饱和时，如将饱和溶液移至冷的环境如 0℃ 时，硫酸铵也同时析出，这时蛋白质溶液的盐析就受影响，产率就会降低，所以在做硫酸铵盐析时，一定要控制好温度。

表 8　不同温度时的饱和硫酸铵溶液

温度(℃)	0	10	20	25	30
每 1000g 水中含硫酸铵摩尔数	5.35	5.53	5.73	5.82	5.91
1000ml 水用硫酸铵饱和所需克数	706.8	730.5	755.8	766.8	777.5
重量百分数	41.42	42.22	43.09	43.47	43.85
每升饱和溶液含硫酸铵 g 数	514.8	525.2	536.5	541.2	545.9
饱和溶液摩尔浓度	3.90	3.97	4.06	4.10	4.13

二、其他盐的盐析

除硫酸铵外,还有其他盐可用来盐析蛋白质。如氯化钠,硫酸钠，硫酸镁等等。这些盐一般都不呈氧化还原性质,还都是中性盐。其中用得最多的是氯化钠。

用氯化钠做盐析剂有许多优点。它价廉,容易纯化,医药工业中有药用氯化钠，可用于药用蛋白质的分离。同时它的溶解度随温度变化只有很小的变化,因此从室温降至4℃左右时不太会析出盐结晶。它的阴阳离子都是一价的，因此离子强度与浓度是相同的。这些优点使得它是蛋白质盐析剂中仅次于硫酸铵的常用试剂。

氯化钠的缺点是溶解度不够高，在它的饱和溶液中还有些蛋白质不能沉淀出来。

其他的盐相对讲用得很少。

酶或蛋白质的结晶

吴 克 佐

（中国科学院上海生物化学研究所）

一、前　　言

一个酶或蛋白质制剂，在经历组织破碎、提取、分离和精制等步骤之后，有时还需要结晶。

结晶作用对蛋白质来讲含有四项重要意义：

(1) 作为一个纯化方法；(2) 作为一个均一性证据；(3) 作为一个稳定的贮存方法；(4) 长成单晶后可提供作X射线衍射分析用材料。

二、基本原理

蛋白质结晶原理与一般小分子的结晶原理略同。

简单地讲，结晶过程类似凝聚过程。就是在一定的溶剂条件下，竭力降低分散相的溶解度，使溶质处于过饱和状态。在合适的过饱和状态下，溶质分子通过扩散、旋转、碰撞等运动方式，形成晶核。结晶时，溶质分子通过适当途径在恰好成90度角时，以相互对撞的作用方式有序而反复地堆砌到晶核上。于是，晶核长大，晶体形成。晶体从溶液中析出。

结晶时，蛋白质与普通小分子的主要差别是，分子的不稳定性和敏感性较大，必需维持其基本水合状态处于或接近于生理 pH 及温度。保持蛋白质分子的天然状态对蛋白质的结晶至关重要。

蛋白质结晶作用由两个因素决定。一个是它的溶解度即热力学平衡因素；另一个是动力学因素，即控制晶核过程和晶核生长。

三、结晶条件

蛋白质溶解度理论是摸索蛋白质结晶条件的路标。下面讨论一些因素。

(1) 沉淀剂　这是改变蛋白质溶解度最重要也是最普遍采用的方法。包括盐类和各种有机溶剂。盐类中最突出的便是硫酸铵。硫酸铵具有强的盐析能力，同时在水中溶解度很高。大多数盐类影响蛋白质的溶解度是起盐析或盐溶作用。有机溶剂也是一种沉淀剂，用于蛋白质结晶的通常是乙醇和丙酮。近来发现两种有机物是理想的使蛋白质结晶的物质，就是聚乙二醇（PEG）和2-甲基-2，4-戊二醇（简称 MPD），有很多实例报道。

(2) **蛋白质纯度** 一般讲，纯度愈高愈容易结晶。晚近一些工作指出，均一性提高对晶体大小、加快结晶过程以及大单晶培养有很大影响。但50年代以前，很多结晶蛋白质是从蛋白质混合物中获得的，有的甚至是粗提液，说明结晶作用对蛋白质纯度有时要求不高。因此，当受试蛋白质达到比较纯的程度时，就可作结晶试验。结晶，也含有进一步分离纯化的目的。

(3) **蛋白质过饱和程度** 蛋白质过饱和程度高，结晶容易形成。但过饱和程度很高时析出的晶体多数是微小晶体。欲获得较大晶体，需经适当稀释。通常球蛋白的浓度采用10—50mg/ml。很少采用浓度低于1mg/ml的。

(4) **晶核** 晶核数在结晶开始，也就是当蛋白质达到过饱和点时就有可能形成。控制晶核数的方法往往是调整过饱和度。一般讲，晶核数愈少愈容易生成大晶体。

(5) **pH** 很多蛋白质对pH相当敏感。pH值改变，晶型也随着改变。有时，无定形沉淀、微晶和大单晶之间的pH差别只有0.2pH单位，或者更小。因此，必须选定恰当缓冲液。

(6) **温度** 这是影响蛋白质溶解度的重要参数之一。大多数球状蛋白质在高盐浓度下，20—30℃时，溶解度最小。这正是盐析法结晶常采用的温度。相反，在低离子强度下，4℃时，大多数蛋白质溶解度最小。已知的蛋白质结晶温度在0—40℃之间。通常选择4℃冷室或25℃温箱进行结晶。

(7) **金属离子和离子强度** 离子强度对很多球蛋白溶解度影响极大。一些金属离子及无机化合物常常有利于蛋白质晶体的形成。如胰岛素、羧肽酶、伴刀豆球蛋白A、超氧化物歧化酶等。

(8) **时间** 晶体形成需要有充分时间。从几个小时到几个月不等，也有近一年的。蛋白质分子庞大所以结晶过程缓慢。从方法上讲，盐析法结晶可能快些，几天或几小时。但晶体质量以及大小，肯定受生长速度支配，即愈慢愈好，愈慢长得愈大。

(9) **其他** 结晶条件还受微量杂质、气泡、还原剂，甚至底物、辅酶、压力、种属来源等等影响，这些都必须给予重视和考虑。

四、结 晶 方 法

一般能沉淀蛋白质的方法都可用作结晶方法。下面举些常见方法。

1. 盐析法

盐析是通过加盐降低蛋白质溶解度，使其从溶解状态转变成过饱和状态，于是以结晶形式离析。结晶用盐如下。

硫酸铵、硫酸钠	柠檬酸钠、柠檬酸铵
磷酸钠、磷酸钾	氯化钠、氯化钾、氯化铵
醋酸钠、醋酸铵	硫酸镁
十六烷基三甲基铵盐	聚乙二醇1000,4000,6000,15000
氯化钙、氯化锂	硝酸铵
甲酸钠	

(1) 加固体盐 将盐于研钵中研细待用。然后取少量受试液作预试。称取定量盐，分批加入。每次加盐应边加边搅动溶液，防止局部盐浓度过高。搅动切忌激烈，特别要避免出现泡沫。待盐溶解后再加下一批。每次盐量应酌量减少。如发觉盐溶解速度明显变慢或因局部盐浓度高而产生的沉淀不易重新溶解，此时应立即停止加盐。待沉淀彻底溶解后，静置片刻。观察溶液有否出现浊光。若有轻微浊光，记下所加盐量。放置。放置后溶液很快变浑并出现沉淀颗粒，说明盐量已过多。待下批实验时校正。本法以维持浊度不消失为度。放置时避免振动。

实例：兔肌醛缩酶结晶。

兔肌以 50% 饱和度硫酸铵溶液抽提，去除沉淀。清液中逐量加入固体硫酸铵，至达 52% 硫酸铵饱和度。放置。结晶缓慢形成，析出。

(2) 加饱和盐溶液 本法即以饱和盐溶液代替固体盐。优点是溶液与溶液易于混和，避免局部盐浓度过高，同时可免除气泡产生。其他注意事项同(1)。

实例：牛胰凝乳蛋白酶原 A 结晶。

每 100g 沉淀滤饼，加 150ml 水使溶解。所得溶液中逐滴加入饱和硫酸铵溶液 50 ml。加入 5mol/L NaOH 调节溶液 pH 值至 5.0。20—25℃ 放置 2 天。长针状结晶逐渐形成。

(3) 透析 市售透析袋，截取所需长度。经 1mmol/L EDTA 钠盐溶液或 1% $NaHCO_3$ 溶液煮沸处理 10 分钟，去除所含杂质，然后用去离子水洗净。浸入结晶用缓冲液中。使用前结扎一端并固定，用吹气或灌注溶液加压下检查袋壁有无漏洞。之后注入待试溶液，结扎另一端。浸入已配制好的结晶盐溶液。内外液的体积比一般为 1:10。结晶过程有时需更换外液几次。

实例：羊胰蛋白酶结晶。

取纯化后盐析滤饼 100g，加 150ml 蒸馏水使溶解。溶液装入透析袋。浸入结晶用盐溶液中。移至 0—5℃ 透析。外透液每隔 12—24 小时更换一次。更换时将透析袋上下轻轻颠倒几次。约一星期结晶完全。

(4) 样品直接溶于结晶用盐溶液 本法利用蛋白质在低温时溶解度高，逐步升高温度溶解度降低的性质，使其从溶解状态很快转变成过饱和状态，并以结晶形式析出。操作时，先将受试蛋白质用硫酸铵沉淀下来，并在低温离心。离心所得盐析物再在 0℃ 用逐步降低浓度的硫酸铵溶液抽提，抽提液然后置室温下使结晶。已有一百多种蛋白质按此法得到了结晶。蛋白用量约 10mg。方法实例参见葡萄糖淀粉酶的结晶。

(5) 蒸发溶剂 溶剂通常指水。即通过缓慢蒸发提高盐浓度。容器一般用 Parafilm 封口，然后在上用针开孔，放置，令其浓缩。

实例：肽酶 A 结晶。

9mg/ml 蛋白质溶液，内含 30% 饱和度硫酸铵，0.15mol/L 醋酸钠，pH4.4，于小烧杯中。杯口封闭，其上端置 1 毛细玻管，溶液通过缓慢蒸发产生结晶。

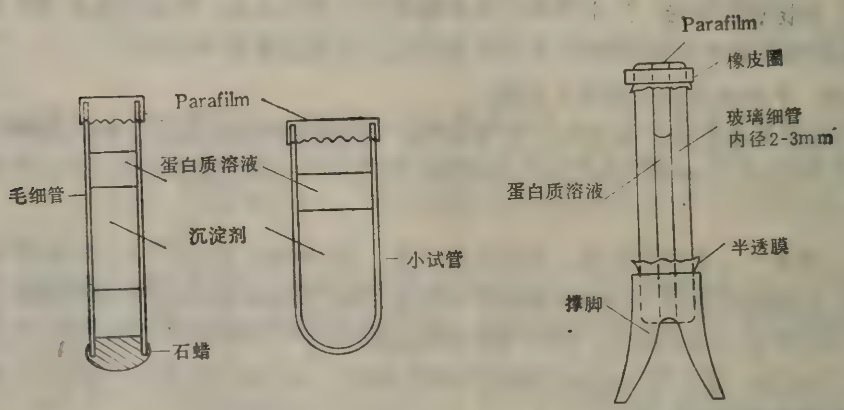
(6) 微量样品 可参照自由界面扩散法、微量扩散法、微量透析法进行。

2. 有机溶剂

有机溶剂分子与水结合后便充当盐离子角色作用，使大多数蛋白质的溶解度降低。其

优点是有机溶剂介电常数小，因而蛋白质水溶液由于它的参入，导致溶液介电常数下降，从而使蛋白质结晶析出。使用时有两点必须注意：第一，有机溶剂浓度不宜过高；第二，加入时局部浓度过高，和因混合热引起的局部溶液温度上升，会引起蛋白质变性。有机溶剂以预冷至0℃左右后加入蛋白质水溶液中为好。常用有机溶剂如下。

乙醇	异丙醇
2-甲基-2,4-戊二醇（MPD）	二氧杂环己烷
丙酮	丁醇
乙腈	二甲基亚砜
2,5-己二醇	甲醇
1,3-丙二醇	α-丁内酯(1,3-丁内酯)



(a)自由界面扩散法　　(b)微量透析平衡法

图 1

(1) 直接加有机溶剂　加有机溶剂时，应边加边搅动蛋白质溶液，尤应注意流速。以逐渐加入为好。可借用分液漏斗或滴定管滴加。须随时测量温度，以观察混合热产

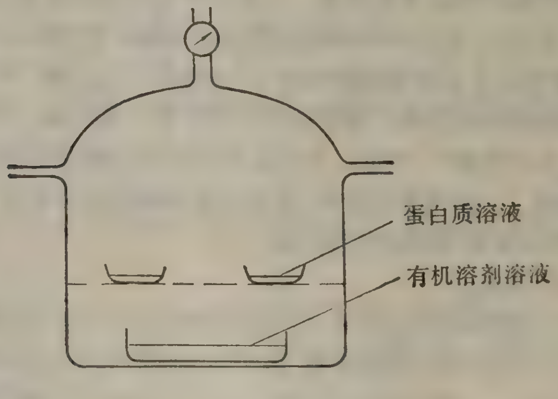


图2　蒸汽扩散法装置

生。另一方法是先将蛋白质溶液冷冻成固态，然后加入有机溶剂。待水溶液慢慢融化，蛋白质便形成结晶。

实例：牛胰核糖核酸酶A结晶。

取冰冻蛋白质溶液先融化其一部分，然后将醇（MPD）溶液边搅动边缓缓加入样品中，使 MPD 浓度达到 55%。置于 24—25℃ 恒温槽。当在部分已融化的样品中添加有机溶剂时，应充分搅拌，以尽量避免蛋白质分子直接与无水有机溶剂接触，因为混合热会使温度上升。

（2）气体平衡扩散 这是利用挥发性溶剂特性，通过气体扩散而将溶剂加到蛋白质溶液中的方法。这样做第一可缩短结晶时间，第二，样品溶液与有机溶剂分别置于密闭容器中如干燥器中，不像方法(1)容易生成无定形。

（3）固体融化 固体系指经过真空冷冻干燥后的蛋白质。方法：先将有机溶剂与水溶液1:1混合，冷却。然后投入上述干粉，成一悬液。一般情形下，蛋白质干粉由浸润膨胀而成粘稠状，再由粘稠状转成结晶。

（4）混合溶剂抽提 实例，脲酶结晶。方法：把重蒸过的丙酮150ml，于 22℃ 时以蒸馏水稀释至 500ml。将此液倒入含 100g 刀豆粉的烧杯中，搅拌 3—4 分钟，用滤纸过滤。过滤先在室温进行，至滤出 150ml 时，连同剩余部分移至 2—2.5℃ 冷室，继续过滤。次日即见结晶在滤液中析出。

3. 等电点结晶

蛋白质溶解度明显受溶液 pH 影响。当蛋白质净电荷等于零即在等电点近侧时，其溶解度往往最小。这一性质可用作等电点结晶。

实例：溶菌酶结晶。

50mg/ml 溶菌酶水溶液，10ml。加入 0.5g 氯化钠，使完全溶解。以 NaOH 调节 pH 至10.5，4℃ 放置。

4. 脱盐结晶

球蛋白易溶于盐溶液而几乎不溶于水。这一性质可用作于结晶。先将蛋白质溶于适当缓冲液，然后分别对去离子水和稀缓冲液透析。

实例：牛胰羧肽酶 B 结晶。

经纯化后的羧肽酶原 B，溶于 pH8，0.1mol/L K_3PO_4，蛋白质浓度 10mg/ml。加适量胰蛋白酶(胰蛋白酶：羧肽酶原 B 的摩尔比为 1:10)，37℃，保温活化。5 小时后，混合液对 pH8，0.01mol/L Tris-HCl 透析，4℃。几小时后结晶开始。连续透析 48 小时，并更换外透液，使结晶完全。

重结晶时，将离心所得晶体加少量 1mol/L 氯化钠使溶，离心去不溶物。清液再对上述 pH8，0.01mol/L Tris-HCl 透析，4℃，结晶很快形成。

5. 温差结晶

有些蛋白质在低离子强度下，对温度特别敏感，其溶解度随温度变化极大。因此可用温差法使其结晶。

实例：25⟶20℃ 猪胰弹性蛋白酶结晶。

蛋白质浓度 9mg/ml，内含 pH5.5 0.05mol/L 柠檬酸钠缓冲液。温度逐渐由 25℃ 降

至 20℃，晶体在 24 小时内形成。

实例：4——>25℃ 大肠杆菌碱性磷酸酯酶结晶。

蛋白质浓度 20—25mg/ml，内含 56% 饱和度硫酸铵，pH8.0，0.05mol/L Tris-HCl 缓冲液及 0.01mol/L $MgCl_2$。溶液温度逐渐从 4℃ 升到 25℃。

6. 金属离子

实例：硫氧还蛋白（thioredoxin）结晶。

本制剂从 pH3.5 到 9.0，各种结晶试验均未获成功。当蛋白质浓度为 5mg/ml 时，用微量透析法，4℃，对外透液（pH4.5，0.01mol/L 醋酸钠缓冲液含 0.001mol/L 醋酸铜，20—25% 乙醇）透析 2 天后，晶体出现。

参 考 文 献

[1] A. McPherson., Methods in Enzymology, H. W. Wyckoff, C. H. Hirs, and S. N. Timasheff, ed, Vol. 114, Academic Press, New York (1985) 112.

[2] J. B. Sumner and G. F. Somers., "Chemistry and Methods of Enzymes" 2nd ed, Academic Press, New York (1947).

[3] J. H. Northrop, M. Kunitz and R. M. Herriott., "Crystalline Enzymes" Columbia Univ. Press, New York (1948).

[4] K. Bailey. *Trans. Faraday Soc.*, **38**, 186(1942).

[5] T. B. Osborne., *Am. Chem. J.*, **14**, 662(1892).

[6] R. K. Scopes., "Protein Purification", Springer-Verlag, New York (1982).

[7] M. Dixon and E. C. Webb., "Enzymes", 3rd ed, Longman Group, London (1979).

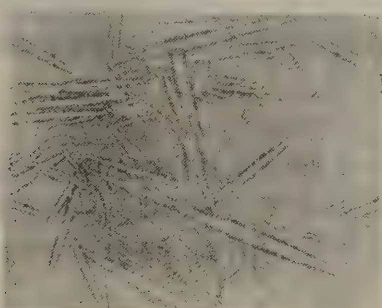
[8] A. McPherson, Jr., Methods of Biochemical analysis, Vol. 23 (1976), 272.

[9] R. Czok and T. Bucher., *Advance Protein Chemistry*, **15**, 315(1960).

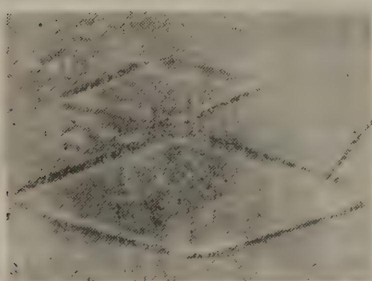
[10] W. B. Jakoby., *Anal. Biochem.*, 26, 295(1968). Methods in Enzymology, Vol. 22, p. 248 (1971).

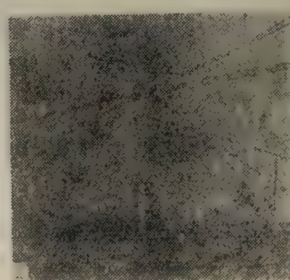
[11] R. Henderson., *Nature*, **287**, 490(1980).

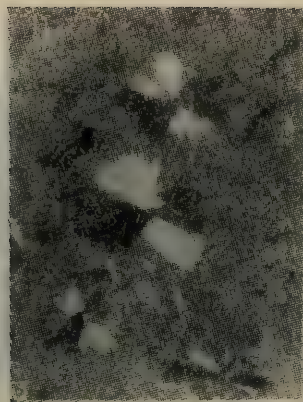
[12] C. W. Carter and C. W. Carter, Jr., *J. Biol. Chem.*, **254**, 12219(1979).

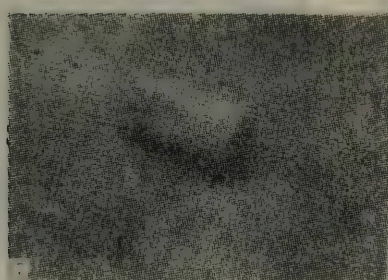


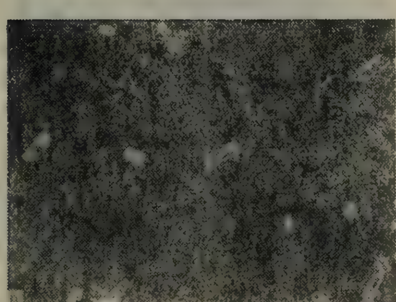
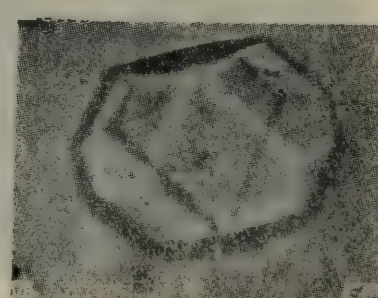
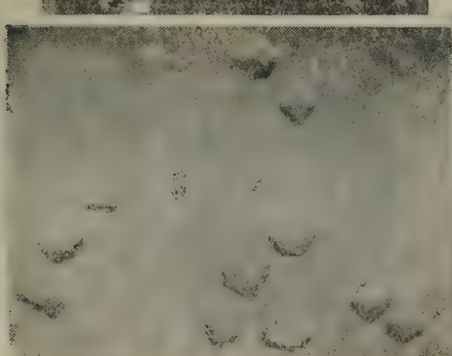
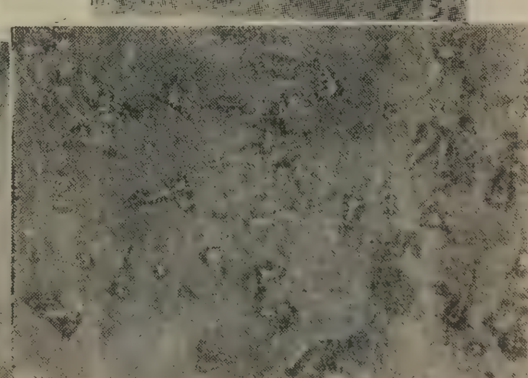


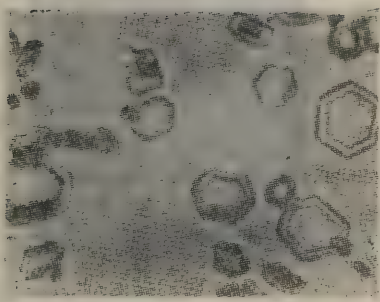
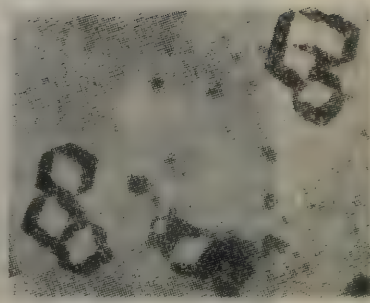
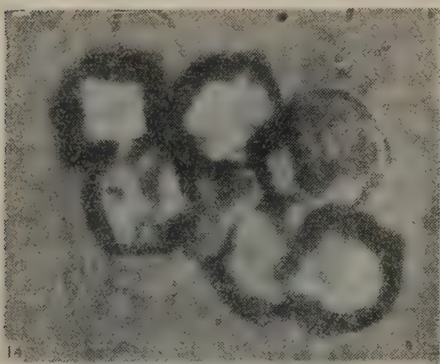


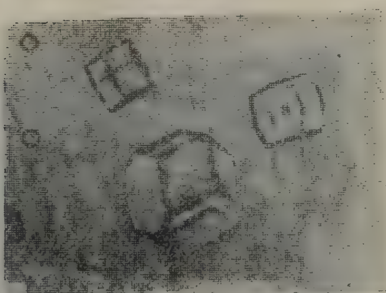
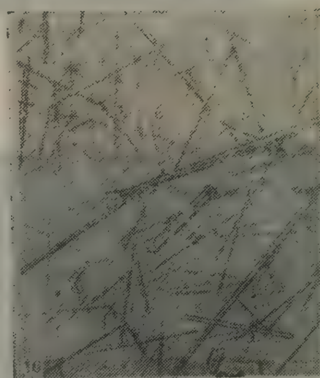


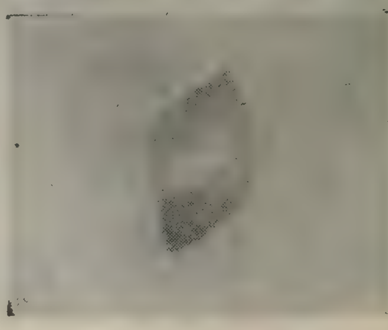


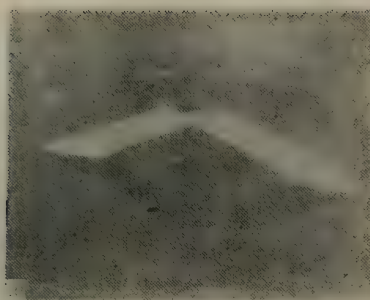


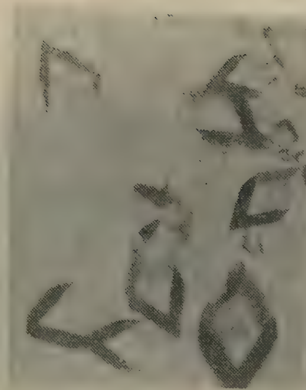





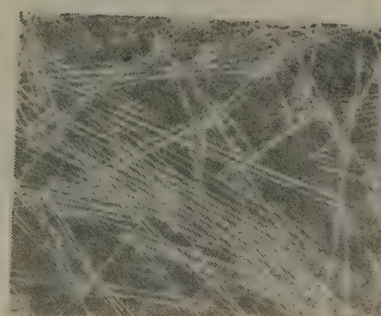



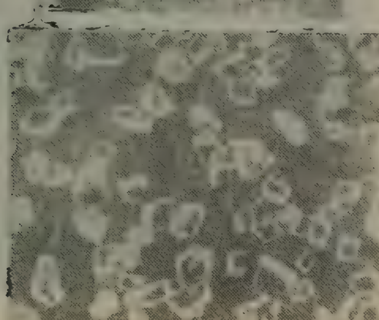


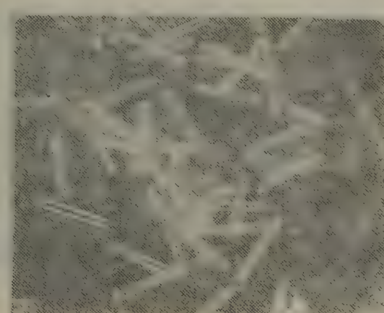


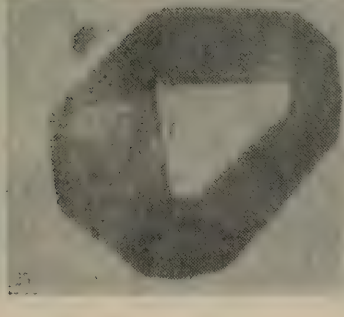


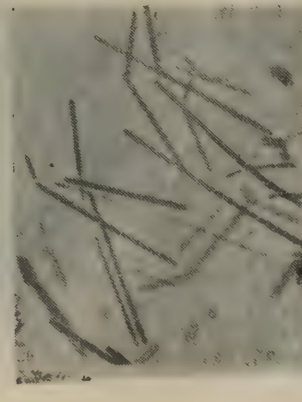


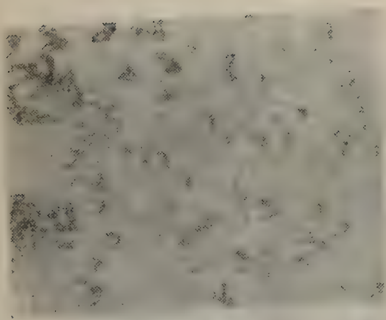


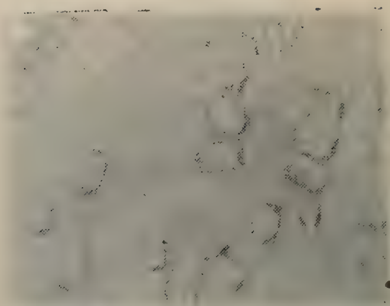


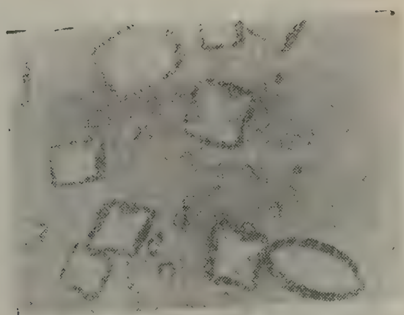


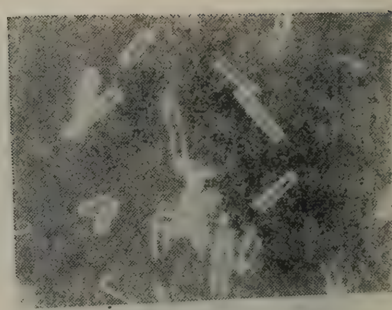


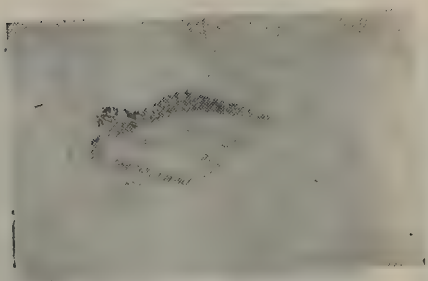


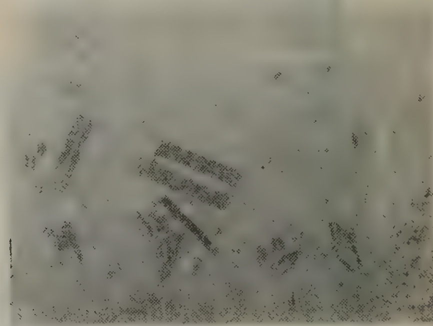


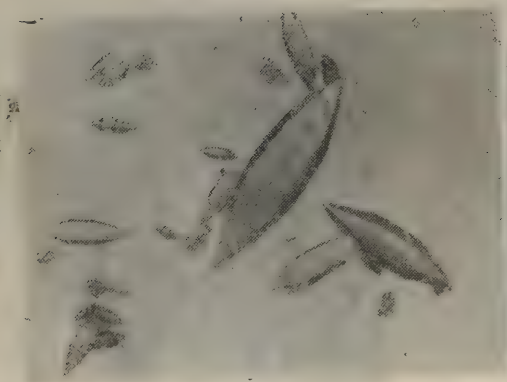


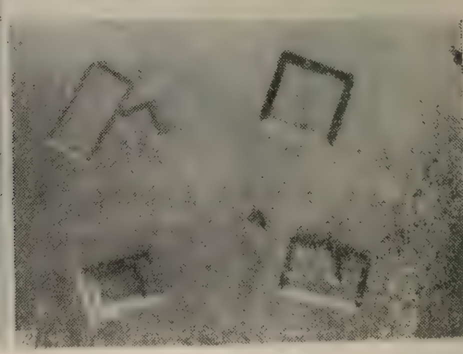




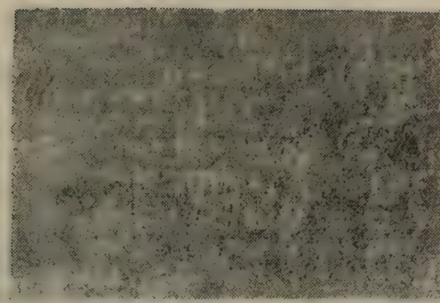


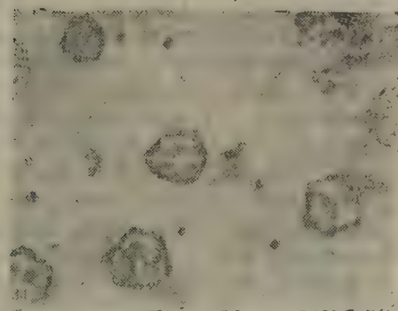


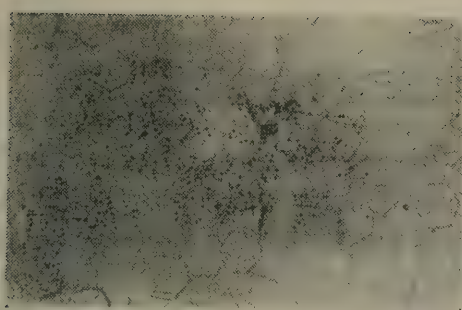












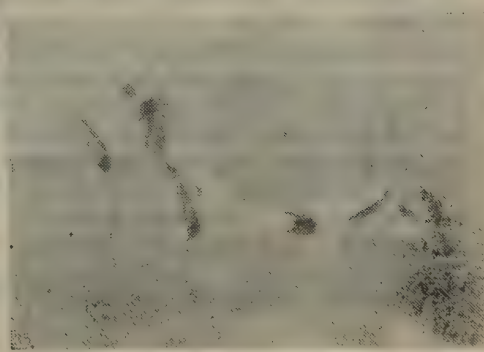


图 版 说 明

1．对虾原肌球蛋白：　生理学报，1955，**19**，389。
2．尖顶蚌闭壳肌原肌球蛋白：　生理学报，1955，**19**，389。
3．汞化兔原肌球蛋白：　生化学报，1958，**1**，287。
4．兔皮原胶原：　生理学报，1956，**20**，164。
5．葡萄糖淀粉酶：　微生物学报，1976，**16**，200。
6．固氮酶钼铁蛋白：　{生物化学与生物物理进展，1981，1，55。植物学报，1973，**15**，281。}
7．天花粉蛋白　科学通报，1978，176—178。
8．半夏蛋白　生物化学与生物物理学报，1981，**13**，77。
9．蝮蛇突触前毒素　生物化学与生物物理学报，1981，**13**，237。
10．蛇胰岛素　中国科学B辑，1981，**7**，图版。
11．鹅胰岛素　科学通报，1982，**18**，1142。
12．白鲢胰岛素　生物化学与生物物理学报，1982，**14**，29。
13．白鲢胰高血糖素　生物化学与生物物理学报，1982，**14**，23。
14．牛胰高血糖素(人工合成)　生物化学与生物物理学报，1975，**7**，119。
15．中华眼镜蛇细胞膜毒素　动物学研究，1981，**2**，No. 4 增刊。
16．牛胰羧肽酶B　*Biochemistry*，1962，**1**，1069.
17．醛缩酶(兔肌)　*J. Biol. Chem.*，1948，**173**，591.
18．硫氧还蛋白　*J. Mol. Biol.*，1970，**54**，387.
19．肽酶A　*J. Mol. Biol.*, 1969, **44**, 569.
20．碱性磷酸酯酶　*J. Biol. Chem.*, 1970, **245**, 4976.
21．核糖核酸酶(牛)　"Crystalline Enzymes" (Northrop, Kunitz, Herriott, 1948).
22．牛胰凝乳蛋白酶原　"Crystalline Enzymes" (Northrop, Kunitz Herriott, 1948).
23．牛胰凝乳蛋白酶　"Crystalline Enzymes" (Northrop, Kunitz Herriott, 1948).
24．牛胰蛋白酶　"Crystalline Enzymes" (Northrop, Kunitz Herriott, 1948).
25．溶菌酶　"Enzymes" (M. Dixon and E. C. Webb), 1979.
26．猪胰弹性蛋白酶　"Enzymes" (M. Dixon and E. C. Webb), 1979.
27．猪胰蛋白酶　"Enzymes" (M. Dixon and E. C. Webb), 1979.
28．羊胰蛋白酶　生物化学与生物物理学报，1966，**6**，32。
29．猪胰糜胰蛋白酶　生物化学与生物物理学报，1963，**3**，191。
30．猪胰糜胰蛋白酶　生物化学与生物物理学报，1986，**18**，448。
31．绿豆胰蛋白酶抑制剂　生物化学与生物物理学报，1963，**3**，229。
32．绿豆 TI＋猪T　中国科学B辑，1985，(7)：628。
33．慈菇抑制剂　*Sci. Sin.*, 1979, **22**, 1443.
34．牛胰岛素(人工合成)　中国科学，1965，No. 11.
35．鹩胰多肽　许英镐，未发表资料，1981。

透　析

冯　佑　民

（中国科学院上海生物化学研究所）

生物化学工作者为了去除蛋白质制剂中的盐或在分离、分析蛋白质、酶或其他生物大分子而需要与特定的缓冲液平衡时，首先想到透析。透析方法的核心部件是一个半透膜（透析膜），一般做成袋状，被透析样品装于袋内，透析时允许溶剂和小分子物质通过透析膜进入透析外液，大分子溶质如蛋白质、酶等留在袋内。驱使小分子物质通过透析膜的力是扩散压，扩散压是由于横跨膜的浓度梯度形成的。在这种力的作用下，小分子不断通过膜直至浓度梯度为零。将扩散方程

$$dS = -Dg\left(\frac{dt}{dx}\right)_t dt \tag{1}$$

改写为

$$\frac{dS}{dt} = kA\frac{(C_0 - C_i)}{\Delta X} \tag{2}$$

dS 为在时间 dt 内通过透析膜的物质的量；A 为透析膜的面积；C_0 和 C_i 为透析膜两侧溶质的浓度；ΔX 为透析膜的厚度；k 为透析膜对给定的溶质的半透性常数。由式(2)可知，透析速度与透析膜的面积、溶质的浓度梯度成正比，与透析膜的厚度成反比。很多透析装置的设计(下面讨论)，都是旨在努力改善上述一个或多个参数以提高透析速度。此外，透析速度还直接受温度影响。一般在4℃左右透析。如果样品稳定，在室温透析，速度会显著提高。

自从 Thomas Graham (1861) 发明透析方法至今已有一百多年了，人们对透析膜的制备、透析装置的设计以及透析方法的应用进行不断的研究，推陈出新，是生物化学实验室中始终处于不衰的技术之一。

一、常规透析方法[1,2]

常规透析方法适用于被透析样品溶液体积1至数百 ml。根据需要保留的分子量大小选择透析袋。现在市售的透析袋，一般都是由再生纤维素做成的，商品名 Spectra/Por。Spectra/Por 透析袋不带有固定的电荷，对绝大部分溶质没有吸附作用，像是一个简单的筛子。不同型号的透析袋其微孔大小不一样，截留分子量（即留在透析袋内的最小分子量，缩写为 MWCO）从 1 000 到 50 000 (表 1)。Spectra/Por 1、2、3 和 4 以干的成卷包装出售，为防止变脆，在出厂前已用 10% 甘油处理过。Spectra/Por 6 是浸在含有 1% 苯甲酸钠防腐液中出售。应该指出，MWCO 值仅是一个参考值，在实际应用中很多因素

表1 一种常用透析袋

型 号	截留分子量	扁平宽度 (mm)	直 径 (mm)
Spectra/Por 1	6 000—8 000	23	14.6
		32	20.4
		50	31.8
Spectra/Por 2	12 000—14 000	10	6.4
		25	15.9
		45	28.6
Spectra/Por 3	35 000	18	11.5
		45	28.6
Spectra/Por 4 (lowest price)	12 000—14 000	25	15.9
		45	28.6
Spectra/Por 6	1 000	12	7.6
		38	24.2
	2 000	12	7.6
		38	24.2
	35 00	18	11.5
	10 000	10	6.4
	25 000	12	7.6
		28	17.8
	50 000	12	7.6
		34	21.6
半微量管	12 000—14 000	4	2.5

会影响分子的通过，所以在透析贵重样品前应进一步鉴定所选择的透析袋。

Spectra/Por 1—4 除含有甘油外，还有很少量杂质如微量重金属和硫化物等。一般在用前用蒸馏水浸泡一定时间，然后用蒸馏水洗数次就可以了。但在某些实验中，如果甘油、重金属离子和硫化物可能对结果有影响，这时需要在透析前彻底除去这些杂质。一般

表2 透析袋(不含重金属和硫化物)

型 号	截留分子量	扁平宽度 (mm)	直 径 (mm)
Spectra/Por 7	1 000	12	7.6
		18	11.5
		38	24.2
		45	28.6
	10 000	10	6.4
		32	20.4
	15 000	10	6.4
		32	20.4
	25 000	12	7.6
		28	17.8
	50 000	12	7.6
		28	17.8

用50%乙醇和10mmol/L碳酸氢钠各浸泡两次，再用1mmol/L EDTA处理，最后用蒸馏水冲洗即可。或选用不含重金属离子和硫化物的透析袋 Spectra/Por 7（表2）。

虽然 Spectra/Por 透析袋可以经消毒蒸锅或冰冻处理而不受损伤，但如果对 MWCO 值要求很高的实验最好不这样处理，否则 MWCO 值可能发生改变。

Spectra/Por 1—4 应贮存在湿度大于35%的环境中，最好装在密封的聚乙烯袋中放在冰箱内。Spectra/Por 6 应贮存在冰箱内并防止防腐液挥发而干燥。在处理和使用时切忌透析袋变干，干了后就不能再使用了。已处理好的透析袋要浸泡在蒸馏水中在4℃贮存待用，如果若干天以后使用则应在水中加防腐剂如叠氮钠等。

向透析袋装样品前，先将袋的一端封好，一般用线绳或橡皮筋等扎紧，现在有市售的专用封透析袋的夹子。如果用透析袋打结的办法封，至少应打两个结，防止溶液漏出。然后向透析袋装满蒸馏水或透析外液，捏紧未封口一端并加适当压力于透析袋检查是否有漏洞。最后将水倾出。装入待透析样品，按上述方法封好另一端，置于盛有足够量透析外液的容器中（一般用量筒或烧杯、三角瓶等）透析。装入样品后，在封透析袋时必需留有足够的空间，以便在透析过程中使溶剂进入袋。浓的蛋白质溶液透析过夜，体积增加50%是正常的，如果不留空间，透析袋会因严重膨胀导致微孔孔径发生改变，甚至透析袋破裂。为了加快透析速度，除多次换透析外液外，一般在容器底部放一磁棒并将容器放在电磁搅拌器上，搅拌透析（图1）。

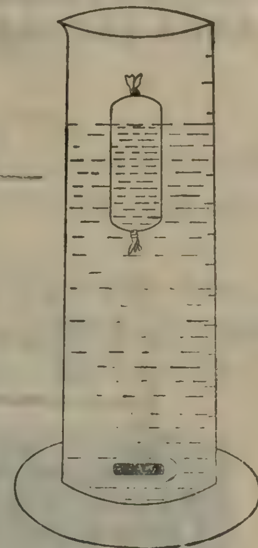


图1　常规透析装置

二、大体积透析

大规模制备酶或其他生物大分子时，需要透析的溶液体积很大，超过数百 ml，用上述常规透析方法很困难。对流透析能很好地适用这种情况。对流透析的基本原理是使被透析液沿透析膜的一侧流动，而透析外液则取相反方向在另一侧流动。对流透析装置很多，有兴趣的读者可参阅有关文献[3,4]，设计制造适合自己要求的对流透析仪。

三、小体积透析

小于1ml 的溶液用常规透析也比较困难。当人们获得纯的生物大分子样品时，要进行物化性质的鉴定和分析，常常面临着要平衡和透析体积小于1ml 的样品溶液。有若干方法可以进行小体积透析，其中最简便的是用细的透析袋。但细透析袋往往 MWCO 值比较大（约10 000以上）。另一简便方法是用普通透析袋进行小体积透析[2]。即在透析袋内放一个用玻璃管做的塞子，将金属棒或汞封在玻璃管内以增加比重。塞子的直径比透析袋略小，长度依待透析液的体积而定。透析时首先把透析袋一端封好，把玻璃塞装入透析袋，再加入被透析液并紧靠玻璃塞上端封好透析袋，然后按常规方法透析。

四、Zeineh 透析器[5]

Zeineh 透析器的原理是对流透析，其构造是将两张透析膜夹在两块有衬垫的树脂玻璃间，形成管状通道，被透析液流经此通道，而透析外液取相反方向从透析膜另一侧流过，使被透析液与透析外液形成连续的对流（图 2）。Zeineh 透析器透析速度快效率高。例如，用该透析器从 30ml 含 3mol/L NaCl 的蛋白质溶液中脱盐，1 小时可脱去 NaCl 99.9%，所用透析外液不到 200ml。如果用常规透析，需要用 1000 多 ml 透析外液，透析过夜，才能达到同样指标。Zeineh 透析器的面积：体积的比例为 $50cm^{-1}$，常规透析只有 $0.5cm^{-1}$，效率提高 100 倍；被透析液和透析外液自然地相对流动，起到了很好的搅拌作

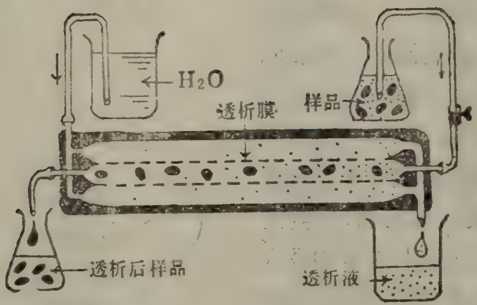


图 2

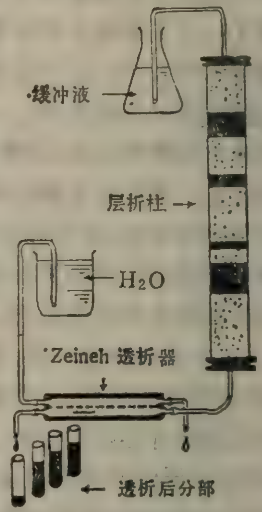


图 3

表 3　Zeineh 透析器

型号	尺寸（英寸）	通径数	通径规格				透析速率（被透析液含 3mol/L NaCl，每小时透析 ml 数）*	
							NaCl 透析效率	
			长（cm）	宽（cm）	深（cm）	体积（ml）	99.9%	95.0%
D-DG	3×3×1	1	5	0.3	0.02	0.05	1	2
D-T	3×3×1	1	112	0.33	0.02	0.50	18	25
D-1	5×5×1	1	260	0.33	0.02	1.30	25	60
L-D-1	7×7×1	1	350	0.5	0.02	3.50	55	140
L-D-3**	7×7×1	3	1050	0.5	0.02	10.50	165	420
LL-D-2**	12×12×1	2	1400	1.1	0.04	30.00	440	1120
LL-D-4**	12×12×1	4	2800	1.1	0.04	60.00	880	2240

* 以 NaCl 为 100%，其他物质透析效率为：KCl 128%，$CaCl_2$ 81%，葡萄糖 46%，甘氨酸 72%，氨基酸 45—62%，硫酸铵 33%。

** 多透析通径 Zeineh 透析器，可透析单一样品，也可每个通径透析一个样品，但透析外液是各通径共用的。1 英寸＝0.0254 m。

用并形成沿着通道的扩散梯度，很大地加快了透析速度；在透析过程中不需要用电和泵。Zeineh 透析器可用于生物大分子大体积的透析，也可用于小体积制剂的透析，还可以和柱层析连接脱去洗出液的盐或平衡洗出液(图3)。美国生物医学仪器公司(BIOMED INSTRUMENTS，INC)已经生产的 Zeineh 透析器列于表3。

五、透析在蛋白质浓缩中的应用

利用透析浓缩蛋白质溶液的方法很多，下面介绍几个常用的方法。

(1) 最简便的方法是将蛋白质溶液装在透析袋内，悬挂在支架上，在室温或 4℃ 用电风扇吹至所需要的体积。也可将装有蛋白质溶液的透析袋埋在 PEG (聚乙二醇)或干的葡聚糖凝胶中，使其吸收溶剂达到浓缩的目的。

(2) C-袋蛋白质浓缩器 (C-bag protein concentrator)：C-袋是装有溶于水的无离子高分子多聚物的、MWCO 值低的透析袋。使用时将 C-袋放在盛有蛋白质溶液的容器中，水经透析膜进入 C-袋被高分子多聚物吸收(图4)。高分子多聚物和蛋白质都不能

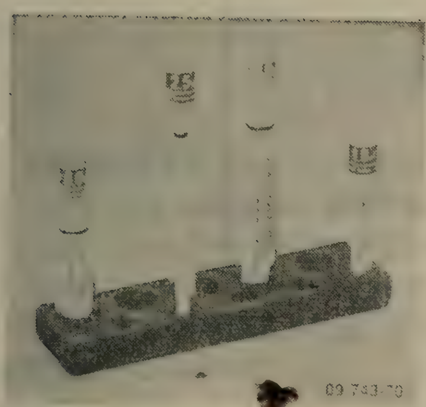


图 4

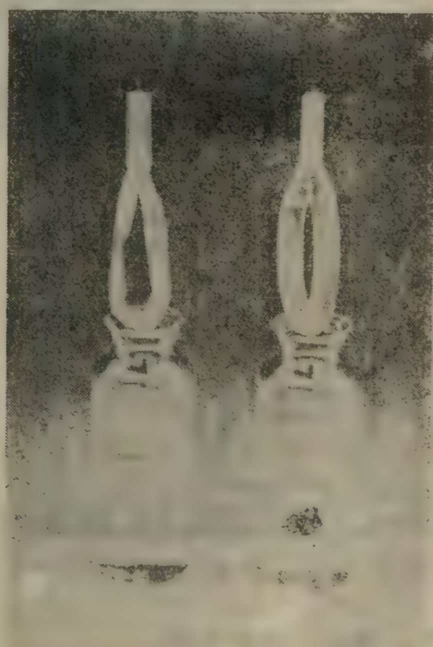


图 5

通过透析膜。C-袋是一个快速简便的浓缩蛋白质溶液的工具，平均每小时浓缩速率 4—5 毫升。目前市售 C-袋有两种，分别可吸收 30 ml 和 60 ml 水。

(3) 指状蛋白质浓缩器：该浓缩器由指状物和浓缩槽组成(图5)。指状物以不锈钢棒作支持由透析膜和浓缩加速剂组成。将待浓缩的蛋白质溶液放入浓缩槽内，把指状物插入其中，浓缩即开始。当指状物插入盛有样品溶液的浓缩槽时，浓缩加速剂产生高渗透压，样品的水份通过透析膜很快被加速剂吸收，而高分子加速剂则不能通过透析膜。目前市售

的这种浓缩器（Spectra/Con Disposable Concentrator）有 1.0、2.5、5.0 和 10ml 四种规格。

(4) 负压蛋白质透析浓缩器：该装置(图 6)可以自动地同时透析和浓缩蛋白质等生物大分子样品至预先选定的体积，是比较理想的透析浓缩器。

核心部件是特制的透析袋（ProDiMem）。ProDiMem 由透析袋和连在底部的用 Polycarbonate 制做的样品收集槽及顶部的凸缘组成的(图 7)。另一重要部件是样品收集棒。透析浓缩时将选定的后者插入前者，可以准确地自动地获得被浓缩样品的最终体积。样品收集棒有不同规格，能使最终体积从 26μl 到 1000μl。透析浓缩时先加透析外液于容器中，装配好后插入 ProDiMem 于容器内，抽气使透析外液变为负压，加入待透析浓缩样品，插入选定的样品收集棒于 ProDiMem 中，最后取出样品。负压蛋白质浓缩器和不同规格的 ProDiMem 及样品收集棒都有市售。ProDiMem 可以用蒸汽消毒但不能让

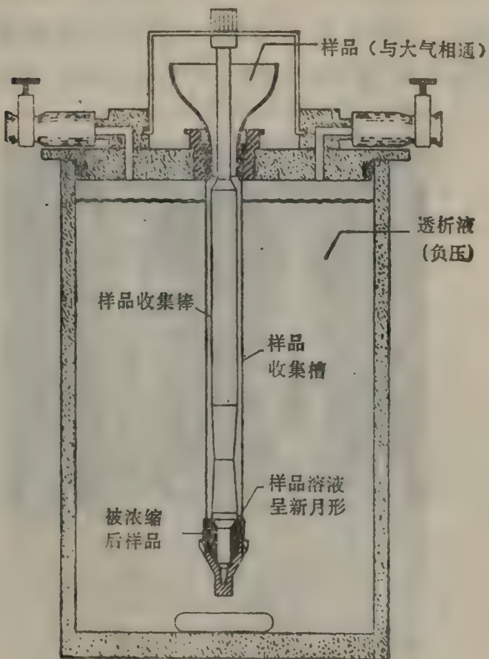
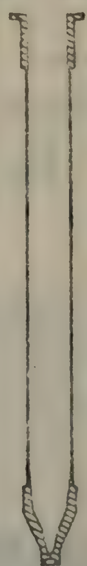


图 6


图 7

其变干，一般在 2—8℃ 贮存。

(5) 中空纤维束浓缩器：该浓缩器由 Fleaker 杯、橡皮帽和支架组成(图 8)。橡皮帽上有四个孔分别插玻璃管和尼龙连接器。核心部件是中空纤维束，是由中空的不同规格的透析膜（MWCO 值 1000—9000)形成的纤维组成的，一般纤维束长 25cm，依不同规格含 22—176 根纤维。小分子溶质可以自由通过透析膜。使用时将样品放在 Fleaker 杯中，通过尼龙连接器装好中空纤维束，塞好玻璃管。为了透析样品，在中空纤维的两端通过连接器分别接蒸馏水和收集器，当蒸馏水流经中空纤维时被透析溶液中的小分子溶质通过透析膜进入中空纤维束，然后随水流流入收集器，大分子样品留在 Fleaker 杯中；浓缩样品时除在中空纤维的一端接减压装置外其余和透析时一样，通过减压装置将溶剂和

通过透析膜的小分子溶质抽出使样品浓缩。

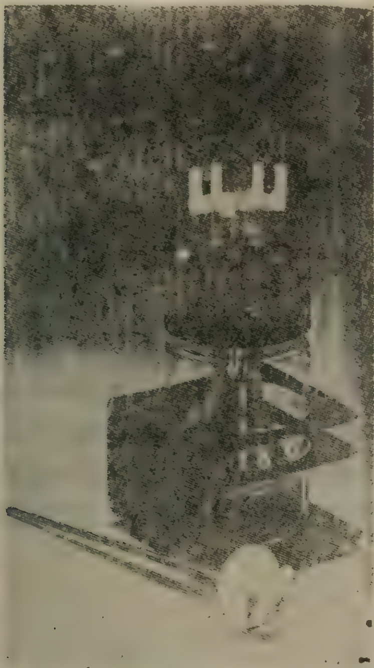


图 8

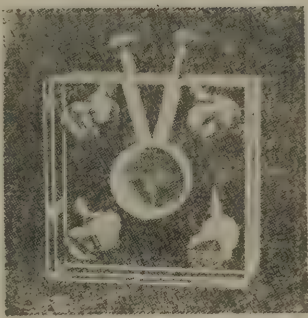


图 9

六、平 衡 透 析[6,7]

平衡透析是透析方法在分析中的应用，特别是在研究小分子物质和离子与生物大分子如蛋白质、酶等相互作用时，常用平衡透析方法。平衡透析装置很简单，在两块有机玻璃或其他材料板上各做一个小池子，两者形状和容积相同，然后将两块板用金属框或不锈钢螺丝固定在一起，在两小池之间放透析膜。在每个小池的顶部留有一个孔以便加入或取出样品(图9)。待测样品加好后，在适当温度下摇动 48 小时至平衡。小池子的容积可根据实验要求选择或制做。

七、结 束 语

透析的原理和核心部件(透析膜)都很简单，由于它是生物化学实验室最简便和最常用的技术之一，一百多年来人们设计和研究了适用于各种目的的大量装置和仪器，这里只列举了其中少数。有兴趣的读者尤其是具有小型工厂的单位或仪器设计部门可自行设计和制作适合自己要求的透析器。实际上透析技术的应用远远超出生物化学实验室，在工业、医药和医疗等都有广泛的应用。

参 考 文 献

[1] Craig, L. C., in Methods in Enzymology, **11**, 870, 1967.

[2] McPhie, P., in Methods in Enzymology, **22**, 23, 1971.

[3] Craig. L. C. & Stewart, K., *Biochemistry*, **4**, 2712, 1965.

[4] Mandeles, S. & Woods, E. C., *Anal. Biochem.*, **15**, 523, 1966.

[5] Zeineh V. K. G. et al., *J. Lab. Clin. Med.*, **79**, 648, 1972.

[6] Malmstrom, B. G., *Arch. Biochem. Biophys.*, **46**, 345, 1953.

[7] Lindskog, S. & Malmtrom, B. G., *J. Biol. Chem.*, **237**, 1129, 1962.

糖蛋白中糖含量的测定

王 克 夷

（中国科学院上海生物化学研究所）

各种糖蛋白中糖含量可有很大的变化，少至不到 1%，多则可达 80%，甚至更高。然而存在于天然糖蛋白中糖的种类却不多，常见的单糖大致可分为三大类：中性己糖，氨基己糖和唾液酸。在有些糖蛋白中还发现有 L-岩藻糖 *（一种 C_6 脱氧己糖）以及木糖和 L-阿拉伯糖等戊糖。糖蛋白中糖含量理应是所有单糖的总和，可是目前通常测定的则是上述三大类单糖。本文也仅介绍这三类单糖常用的测定方法各一种。如若读者有需要可以参阅已发表的众多的参考文献，例如参考文献[1—3]及其后所引的文章。

一、 中性己糖的测定

测定中性己糖的方法，很多是比色法，常用的显色剂有蒽酮、5-甲基间苯二酚等，使用这些显色剂一般都需要沸水浴加热。1956 年 Dubois 等[4]，首先应用的酚-硫酸法却不用加热，同时重复性和灵敏度也较好。此方法另一特点是蛋白质存在对显色反应影响不大。因此，酚-硫酸法更适合于直接测定糖蛋白中的中性己糖。这里介绍的是经改进的酚-硫酸法[5]。

试剂： 分析纯的硫酸，比重为 1.84。5%（w/w）酚溶液：5g 重蒸酚加入 95ml 蒸馏水，摇匀备用。

过程： 0.5ml 内含 2 至 25μg 中性己糖的溶液置于（13 × 100mm）的试管中，加入 0.3ml 5% 酚溶液。混和后，快速加入 1.8ml 浓硫酸。振摇混和。室温放置 20 分钟，即呈现橙黄色，可在 490nm 比色测定。室温过夜，颜色依旧稳定。所用样品最好重复两份。以水代替糖溶液作为比色测定的空白。

说明： 这方法不需沸水加热，显色反应所需热量来自浓硫酸和水的混和。因此，加浓硫酸时，或用流速较快的移液管，将硫酸于 5 至 10 秒内全部加到样品溶液的表面上，然后剧烈振摇混和；或沿试管壁加入，但同时用振摇器迅速混和。为了使浓硫酸和样品混和迅速，放出足够的热量，建议使用较粗的试管，同时试管又要有一定的长度，以免反应放出的热量烫手。

这方法不仅可以测定中性己糖，也可测定它们的甲基化衍生物。戊糖和 6-脱氧己糖也能用此方法显色，但反应产物的最大吸收发生位移。

氨基己糖不能用这方法显色，但经过简单的脱氨反应后，仍可测定[6]。

---

* 本文中所提及的糖，凡未表明 L-型的，均为 D-型。

二、 氨基己糖的测定

Elson-Morgan 法[7,8]是最常用的测定乙酰氨基己糖的方法。氨基己糖的测定也使用这一方法，只是应先将氨基己糖乙酰化。

试剂：5% 乙酸酐：用冰水配制，贮放冰中，每天必须配置新鲜的溶液。饱和 $NaHCO_3$ 溶液。5% $K_2B_4O_7$（或硼砂）溶液。16% 对二甲氨基苯甲醛：16g 对二甲氨基苯甲醛溶于冰乙酸-盐酸(95:5)混合溶液中。

过程：40μl 样品溶液(含 2.2 至 22 微克氨基己糖）置于具塞试管中，先后加入 10μl 饱和 $NaHCO_3$ 溶液和 10μl 5% 乙酸酐溶液，室温放置 10 分钟。这一步骤是使氨基己糖乙酰化，乙酰氨基己糖的测定，可免去这一步。然后加入 50μl 5% $K_2B_4O_7$ 溶液，加塞煮沸 7 分钟，立即取出样品，并放入冰浴中。加入 500μl 冰乙酸和 200μl 16% 对二甲氨基苯甲醛溶液后，37℃ 保温 20 分钟，立刻在 585nm 测定光吸收。

说明：反应产物的颜色随时间而变淡。在冰浴中放置，30 分钟不褪色。

和 $K_2B_4O_7$ 溶液混和后，样品加热时间不同，最终发色率也不同。实验结果表明，加热 7 分钟为好。为了得到理想的实验重复性，加热时间应严格控制。

三、 唾液酸的测定

硫代巴比妥酸已被用于多种脱氧糖的测定。唾液酸是一类3-脱氧-2-酮糖酸，故目前也用于唾液酸的测定，最早为 Warren[9] 提出，后经一些实验室改进[10,11]。

试剂：25mmol/L 过碘酸溶液，以 0.125N 硫酸为溶剂。1.6% 亚砷酸钠配制在 0.4% 盐酸中。0.1mol/L2-硫代巴比妥酸的水溶液，用当量 NaOH 调至 pH9.0。乙二醇甲醚或丙酮-盐酸混合液(97.5:2.5V/V)。

过程：0.2ml 唾液酸溶液(内含 3 至 15μg 唾液酸）置于具塞试管中，加入 0.1ml 过碘酸溶液，37℃ 保温 30 分钟。然后加入 0.1ml 亚砷酸钠溶液，振摇试管至棕黄色消失。在加入 1.0ml 硫代巴比妥溶液后，加塞，在沸水浴中严格加热 7.5 分钟，随即置于冰浴中。最后加入 2ml 乙二醇甲醚或酸丙酮溶液，振摇至溶液完全混和均匀。如果最后加入的是乙二醇甲醚，则测定 552nm 的光吸收；如果加入的是酸丙酮，则测定 551nm 的光吸收。

说明：硫代巴比妥酸溶液每天要新鲜配置。氧化剂和还原剂则在冰箱中至少可保存一月。

蛋白质对这一测定过程有干扰。大量的岩藻糖等也会引起 552nm 光吸收下降[9]。脱氧核糖的存在，可以生成红色产物，但其最大吸收在 532nm[9]。

以上三种方法可以测定中性己糖、氨基己糖和唾液酸这三大类单糖。但各种中性己糖、氨基己糖的吸光率却有所不同。例如甘露糖在 490nm 的吸光率大于半乳糖；用 Elson-Morgan 法测定乙酰氨基己糖时，乙酰氨基半乳糖的吸光率仅是乙酰氨基葡萄糖的

35%。因此本文中介绍的测定糖蛋白中糖含量也只能是粗略的测定。如若要精确地定量，则应先从糖蛋白上水解得到各种单糖，然后再分离各种单糖加以测定。甚至还需测定其他一些单糖，如 L-岩藻糖、木糖等。液相单糖自动分析法[12]和糖类的气液层析[13]、高效液相层析技术[14]可满足精确定量的要求。

结合状态的氨基己糖和唾液酸都无法测定。因此，首先应进行水解。用 0.1N H_2SO_4，80℃ 水解 1 小时，可使唾液酸从糖蛋白上释放出来。而乙酰氨基己糖的水解条件是 4mol/L HCl 中封管，100℃ 4 到 8 小时。为了分别定量各种中性己糖，则用 2N 三氟乙酸，100℃封管水解 2 到 4 小时。

参 考 文 献

[1] Dische, Z., Methods Carbohydr. Chem., 1, 507, (1962).
[2] Spiro, R. G., Methods in Enzymol. 8, 3, (1966).
[3] Aminoff, D., Carbohydrats. Chemistry and Biochemistry, IIB. eds. Pigman, W. & Horton, D., 2nd ed., p. 739, 1970, Academic Press, New York.
[4] Dubois, M. et. al., *Anal. Chem.*, 28, 350, (1956).
[5] McKelvy, J. F. & Lee, Y. C., *Arch. Biochem. Biophys.*, 132, 99, (1969).
[6] Lee, Y. C. & Montagomery, R., *ibid.*, 93, 292, (1961).
[7] Elson, L. A. & Morgan, W. J. T., *Biochem. J.*, 27, 1824, (1933).
[8] Strominger, J. L. et. al., *J. Biol. Chem.*, 234, 3263, (1959).
[9] Warren, L., *ibid.*, 234, 1971, (1959).
[10] Aminoff, D., *Biochem. J.*, 81, 384, (1961).
[11] Uchida, Y. et al., *J. Biochem.* (Tokyo), 82, 1425, (1977).
[12] Lee. Y. C., Methods in Enzymol., 28, 63, (1972).
[13] Laine, R. A. et al., Methods Enzymol., 28, 159, (1972).
[14] Honda, S., *Anal. Biochem.*, 140, 1, (1984).

蛋白质的水解

林 南 琴

（中国科学院上海生物化学研究所）

蛋白质的水解，一般有两种可能。一是把大分子的蛋白质裂解成小分子肽的碎片，另一种是完全水解成游离氨基酸。本节将介绍后一种情况，用于测定蛋白质的氨基酸组成。蛋白质水解的方法很多，常用的有酸水解、碱水解和酶解等。由于酸水解比较简便、水解后只需蒸发可把残余的酸除去，因而广泛采用。碱水解在水解后需用酸中和，生成的盐对以后的分析有干扰，酶解则难以使全部样品都生成游离氨基酸，故后两种方法仅在特殊情况下采用。酸水解也有其缺点，水解后，有少数氨基酸遭到不同程度的破坏，但如果注意水解条件，可以减少破坏，对于遭受破坏的部分氨基酸如加以校正数字，仍能得到较为精确的数据。

一、酸 水 解

盐酸（AR 级）是常用的酸，所用的盐酸需重蒸，浓度为 5.7mol/L。方法是将浓盐酸用蒸馏水冲稀一倍，在全磨口蒸馏器中，常压重蒸三次，每次收集恒沸点馏分，110—111℃，即得浓度为 5.7 的盐酸。

水解用的玻璃管需用硬质玻璃制成，形状为底部蛋形，使用前，将玻璃管用 6mol/L 盐酸浸泡数小时，然后，用水冲洗干净，最后用玻璃再蒸馏水洗一次，烘干备用。

水解，将样品约 10nmol 和 5.7mol/L 盐酸 0.5ml 加入水解管中，为了防止个别氨基酸水解时被破坏，在样品管中加入 0.1% 酚或巯基乙醇。然后，水解管在氧气喷灯上将距管子口约 1cm 处拉细，待冷却后，将管子液体部分浸入干冰乙醇浴中，使样品溶液立即冷冻，然后将水解管口与真空油泵相联，抽真空至 25 nm 以下，将管子从冰浴中取出，在室温下，冰冻样品逐渐融化成透明溶液时，不断振摇管子，除去溶解于液体中的空气，立即封管，置于 110℃ 烘箱中 24 小时。保温时，将玻璃管埋在沙浴内，避免管子受热不均匀而爆炸。水解结束后，冷却，开管，真空下把盐酸蒸干后，即可分析氨基酸组成。

水解时间，一般蛋白质在 24 小时可以完全水解成游离氨基酸，对于小肽，只需水解 16 小时已经足够了。蛋白质中某些肽键，如 Val-键在水解 24 小时还不能水解完全，需要更长的时间。因此，常常在未知蛋白质样品的氨基酸组成的精确分析时，从不同的水解时间，如 24、48、72 小时，得到的分析数据进行比较，取其中的最高值为标准。

酸水解中的氨基酸破坏情况，在上述操作条件下，色氨酸全部破坏，丝氨酸和苏氨酸破坏约 10—15%。在巯基乙酸或醇存在下可减少色氨酸的破坏，可以测出色氨酸的数值。

1 酸水解条件下一些氨基酸的变化

1. 水解 11 至 70 小时维持不变的氨基酸有 Asp、Glu、Pro、Ala、Met、Gly 和 Tyr。

2. 随着水解时间的延长其值增加的有 Lys、His、Arg、Val、Ile、Leu 和 Phe。

3. 随着水解时间增长而量减少的有 Thr 和 Ser。

水解也可用恒沸盐酸迴流、或以甲酸：盐酸＝1:1(5ml/g 蛋白质) Ser 和 Thr 的回收为90—95%。

二、碱 水 解

2mol/L 氢氧化钠在硬质玻璃管中，使样品溶解，封口，110℃ 水解 2 小时，可使样品完全水解成游离氨基酸。冷却后，开管，用 2mol/L 盐酸中和。色氨酸在碱水解中较少破坏。如果在水解时，再加入 5% $SnCl_2 \cdot 2H_2O$，则色氨酸破坏更少。因此，碱水解法经常用于测定色氨酸。

1 蛋白质中 Trp 的测定

碱水解用 600mg $Ba(OH)_2 \cdot 8H_2O$ + 0.5mlH_2O，置于水解管中，按上法封口。120℃ 加热 15 小时，防止爆炸、水解管置于沙浴内。冷却，开管后用 3.5ml 6mol/L HCl 中和、然后测定 Trp 的含量。

Trp、Cys 定量回收，也可采用4-N-甲基磺酸含 0.2%3-2-氨乙基-吲哚[3-(2-amino-ethyl) indole]水解，在 115℃ 保温 22—72 小时，水解液用赤苏醇 (dithiothreit) 处理，然后加过量连四硫酸盐 (tetrathionate)。测定 Trp、Cys 都能接近理论值。此法的优点是水解液，中和后可以直接用氨基酸分析仪测定，但唯一的缺点是样品内含糖、如糖蛋白能使色氨酸降低回收率。

三、酶 水 解

用胃蛋白酶，枯草杆菌酶或其他专一性低的蛋白水解酶可把蛋白质的多肽链裂解成很小的碎片，再用氨肽酶或羧肽酶水解成游离的氨基酸。但此法很少用于组成分析。

四、二硫键的定量分析

盐酸水解的蛋白质水解液，用于氨基酸自动分析，所得的胱氨酸数值偏低。但在蛋白质水酶前，先经过甲酸氧化把蛋白质中的半胱氨酸都氧化成磺基丙氨酸 (cysteic acid) 后，经氨基酸自动分析仪可以测得蛋白质分子二硫键的准确数值。

过甲酸的配制。 含量为 99% 的浓甲酸 (AR 级)，加 33% 过氧化氢 (AR 级)、以 95:0.5 的比例混合，室温放置 2 小时，于冰浴中冷却后，取 0.5ml 加入含 10nmol 样品，放置 10 分钟，置于含粒状氢氧化钠的干燥器真空蒸干。然后，再按上法用 5.7mol/L 盐酸水解测定氨基酸的组成分析。

超滤法及其应用

夏 其 昌

(中国科学院上海生物化学研究所)

超滤法是一种根据溶液中分子的大小和形态,在埃(10^{-10}m)数量级选择性过滤的技术。这种方法,在一定的压力下(外源 N_2 压或真空泵压),使溶剂和较小分子的溶质能通过一定孔径的薄膜,大分子的溶质则不能透过,从而可以使高分子物质脱盐、脱水和浓缩;在一定的条件下,还可以起到分离和纯化的作用。从另一角度来看,超滤也可以认为具有溶液相的分子筛作用,根据所用超滤膜的型号不同,可以在分子量 500—100 000 内进行筛分。

超滤主要作为一种浓缩蛋白质和酶的方法,具有三大优点:(1)在整个工作过程中,条件温和。与蒸发、冻干等其他方法相比,没有相的变化,可以维持原来的 pH 和离子强度,并可在低温下操作,这样就不致使蛋白质和酶在浓缩过程中变性、失活或自溶。因此对不稳定酶的浓缩尤其适用。(2)应用过程中不需添加任何化学试剂,设备和运转费用均较低廉,是一种比较经济的方法。(3)在浓缩的同时还可以除去一些低分子量的物质,具有一定的纯化作用。如果在分级分离的方法学方面获得较大的进展,可以预见,超滤法在蛋白质和酶的分离提纯上,将会起相当大的作用[1]。

近年来,超滤法越来越多地为生物制品工业、食品工业、多聚物工业以及三废处理等方面广泛地采用。当然,超滤法也有一定的局限性,例如它和其他浓缩方法相比,不能直接得到干粉制剂,对于蛋白质溶液一般只能得到 10—50% 的浓度。

一、膜

膜在超滤技术中是一个关键的部分。膜有各种不同的类型和规格,可根据工作的需要来选用。目前常用的一些膜的规格见表 1。

1. 膜的结构

早期的膜是各向同性的均匀膜,即现在常用的膜滤技术中使用的微孔薄膜。Millipore 公司生产的各种微孔薄膜的孔径见图 1。其中 0.05μm 和 0.025μm 孔径的膜曾经用作超滤。近几年来发展了一些各向异性的不对称超滤膜。一种各向异性扩散膜是由一层非常薄的、具有一定孔径的多孔"皮肤层"(厚约 0.1—1.0μm),和一层相对厚得多的(约 1mm)更易通渗的、作为支撑用的"海绵层"组成(图 2b)。皮肤层决定了膜的选择性,而海绵层增加了机械强度。由于皮肤层非常薄,因此高效、通透性好、流量大,且不易被溶质阻塞而导致流速下降。Amicon 公司生产的各种 Diaflo 薄膜即属于这种类型,它的型号参见表 1

表 1　常用各向异性超滤膜

型　　号	制造单位[1]	组　　成	水通透性 100 psi[2] 时的流速 ($ml/cm^2/min$)	分子量截止值 (保留 80—100%)
	1	纤维型		
Diaflo UM-05	2	高分子电解质络合物	0.05	350 (蔗糖)
Diaflo UM-2	2	高分子电解质络合物	0.1	600 (棉子糖)
Diaflo UM-10	2	高分子电解质络合物	0.3	10,000 (葡聚糖10)
Diaflo PM-10	2	芳香族多聚物	0.5	10,000 (细胞色素 C)
Diaflo PM-30	2	芳香族多聚物	0.7	30,000 (卵白蛋白)
Diaflo XM-50	2	烯类物质	0.7	50,000 (白蛋白)
Diaflo XM-100	2	烯类物质	0.9	100,000 (7S 球蛋白)
Diaflo XM-300	2	烯类物质	1.1	300,000 (脱铁蛋白)
HFA-100	3	醋酸纤维	0.07	10,000 (葡聚糖 10)
HFA-200	3	醋酸纤维	0.40	20,000 (葡聚糖 20)
HFA-300	3	醋酸纤维	1.40	70,000 (白蛋白)
PSAC	4	纤维型	1.2	1,000 (溴甲酚绿)
PSED	4	纤维型	0.75	25,000 (α-胰凝乳蛋白酶)
PSDM	4	纤维型	1.0	40,000 (卵白蛋白)

1) 1——上海医药工业研究院；2——Amicon Corp.；3——Abcor Inc.；4——Millipore Corp.
2) 14.70 psi = 1 大气压。

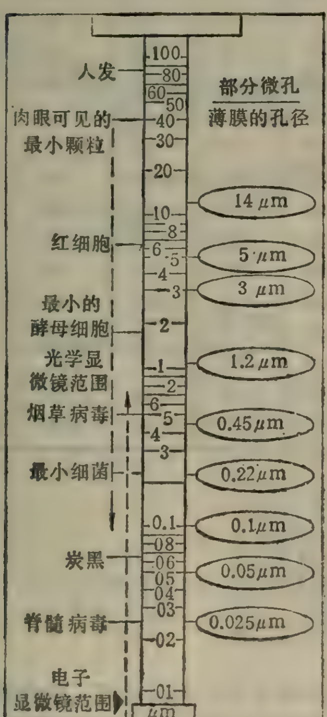


图 1　微孔薄膜孔径和细菌、微粒子大小的比较

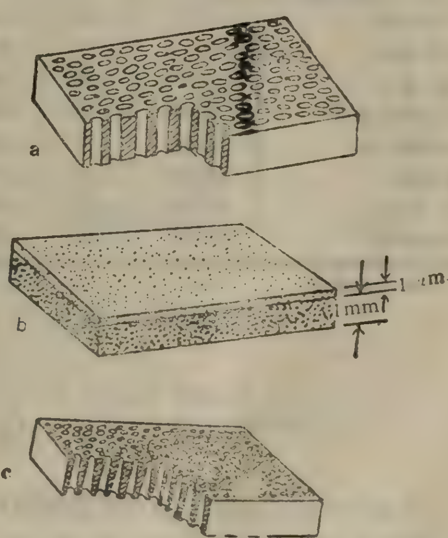


图 2　不同类型超滤膜的纵切面模式图
a——各向同性微孔膜；b——各向异性扩散膜；c——各向异性微孔膜。

和表 2。另一类各向异性的微孔膜,如 Abcor 公司生产的各种 HFA 型超滤膜(图 2c),它的纵切面呈喇叭口型。显然它也要比毛细管型的各向同性超滤膜性能好,流量大,亦不易被溶质阻塞。

上述各种膜有不同的大小(直径由 13mm 到数百 mm)。此外,还有螺旋膜、管形膜和空心纤维丝膜[2]。

2. 膜的化学组成和稳定性

膜一般由醋酸纤维或硝酸纤维或此二者的混合物制成。近年来为适应制药和食品工业上灭菌的需要,发展了非纤维型的各向异性膜。这种膜在 pH1—14 都是稳定的,且能在 90℃ 下正常工作。超滤膜通常是比较稳定的,若使用恰当,能连续用 1—2 年。暂时不用,可在 1% 甲醛溶液或者 0.2% NaN_3 中保存。

表 2 Diaflo 超滤膜的溶质分子保留百分数(%)

溶质	分子量	UM-05*		UM-2	UM-10	PM-10	PM-30	XM-50	XM-100
		pH5	pH10						
D-丙氨酸	89	80	15	0	0	0	0	0	0
DL-苯丙氨酸	165	90	15—20	0	0	0	0	0	0
色氨酸	204	80	15—20	0	0	0	0	0	0
蔗糖	342	80	80	60	10	0	0	0	0
棉子糖	594	90	90	80	50	5	0	0	0
杆菌肽	1 400	75	75	60	50	35	20	0	0
细胞色素C	12 400	>95	>95	>95	90	90	0	0	0
聚乙二醇	16 000	>95	>95	>95	80	—	—	—	—
肌红蛋白	17 800	~100	>95	>95	<95	90	65	0	0
α-胰凝乳蛋白酶	24 500	~100	~100	~100	>95	70	—	0	0
胃蛋白酶	35 000	~100	~100	~100	~100	>95	85	80	0
卵白蛋白	45 000	~100	~100	~100	~100	~100	>95	80	0
血红蛋白	64 000	~100	~100	~100	~100	~100	~100	90	0
人血清白蛋白	67 000	~100	~100	~100	~100	~100	~100	90	10
葡聚糖 110	110 000	~100	~100	~100	~100	30	20	10	0
醛缩酶	142 000	~100	~100	~100	~100	~100	~100	>95	20
γ-球蛋白	160 000	~100	~100	~100	~100	~100	~100	~100	90
脱铁蛋白	480 000	~100	~100	~100	~100	~100	~100	~100	~100

* 离子交换膜。

二、仪器设备

现有约十个厂商生产超滤仪器设备,大体上可分为四种类型:静止态型,搅拌或震动型,错流湍动型,错流薄层层流型(图 3)[3]。

Charm 和 Lai 曾对过氧化氢酶用 PM-30 膜比较了各类仪器流速性能和酶的失活情况[4]。

1. 静止态型

这是一种早期的超滤器，类似目前的膜滤技术。它易形成浓度极化现象而引起流速下降。

在超滤过程中，溶液与膜表面之间总会形成一个浓度梯度，越接近膜表面浓度越高，这种现象称为浓度极化现象（图 4）。

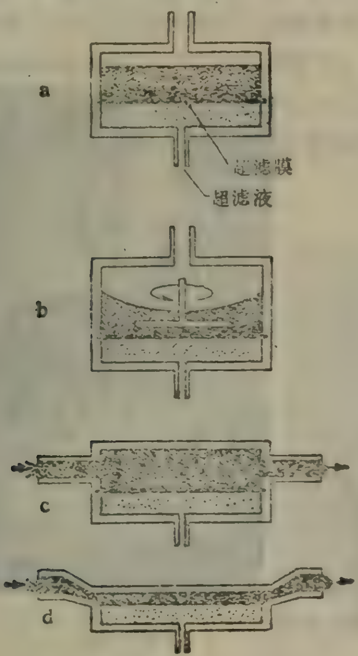


图 3　几种类型超滤器的模式图

a——静止态型；b——搅拌型；c——错流湍动型；d——错流薄层层流型。

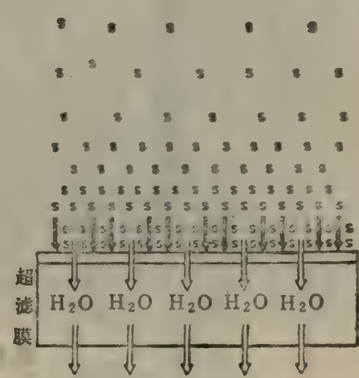


图 4　滞留溶质的浓度极化现象

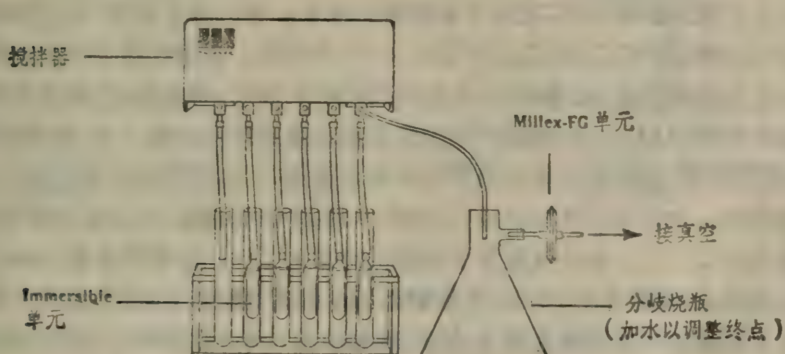


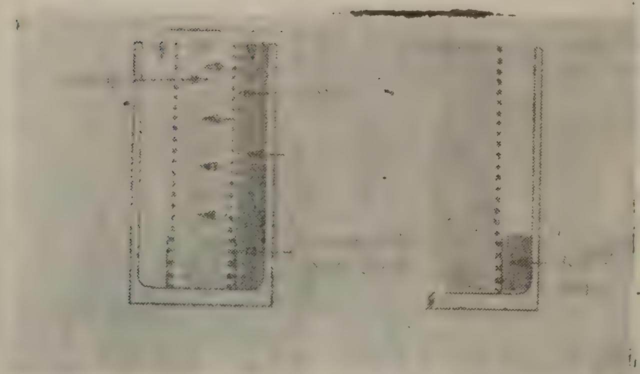
图 5　浸入型的小超滤器

近年来，发展了一些超小型的过滤器，被广泛采用。

(1) 浸入型　整个超滤器仅小手指那么大，可处理几十毫升样品。商品名为 Immersible CX™ (Millipore 产品)，只需把小型超滤器浸到试管或容器中，一端联接到

真空系统(图 5),即可使溶液达到浓缩之目的[7]。

(2) **Minicon™-cs15** (**Amicon 产品**)　Minicon 及其同系列产品是可弃式的多单元超滤器,用不到任何辅助设备。每个超滤器有 10 个分隔的小单元,可以同时进行 10 个相同样品或不同样品的浓缩,每个单元容纳 2.5ml 样品,单元的内表面是选择性的超滤膜(图 6A),溶剂或小分子溶质能渗透过膜到厚的吸收层(海绵质的纸层),样品因此浓缩而体积减小,单元小室外标明 5x、10x、20x 和 80x,分别代表浓缩情况,整个操作只需用滴管滴入或取出样品(图 6B)。



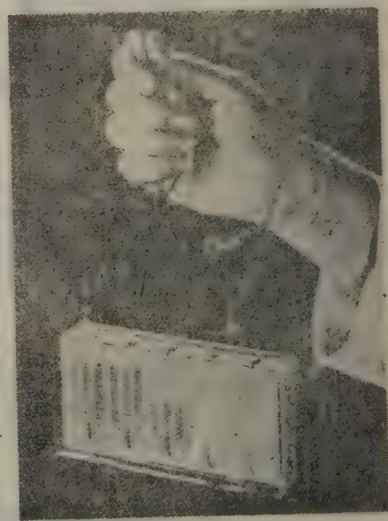


图 6　Minicon-系列超滤器

2. 搅拌或震动型

膜简单地安置在多孔支持物上,在膜上端有搅拌装置或震动装置,这样能使膜表面累积的大分子层分散到溶液中去,减低了浓度极化现象。在这种系统中,单位时间内通过液体的体积与可交换面积成正比,压力可加到 4—5 大气压。这类仪器在实验室最常用。图 7 是上海生化所仿制产品,超滤杯(3)由聚碳酸酯材料制成,超滤膜(7)放置在多孔聚乙烯一类物质的支持片(8)上;搅拌磁芯(9)用聚四氟乙烯或有机玻璃封闭,仪器的顶部(2)和底座(5)由尼龙制成,联结部分均由硅橡胶的环状垫圈(4)借不锈钢的固定架(1)夹住;顶部有一安全阀(6),此处旋开可以进样,工作时拧紧,顶部侧边是 N_2 压进口装置(10),底座上有超滤液的出口(11)。整个仪器置于电磁搅拌器上工作。超滤杯容量 10ml,搅拌最小有效体积为 1ml,超滤膜直径 2.5cm,有效膜面积 3.6cm²,最大工作压力约 5 大气压。这种仪器也可扩大超滤杯容量到数百毫升。这种超滤器自上海生化所和上海医工院试制后,国内已有很多厂商生产此类产品。

3. 湍流型

它是在比较大的管道(25.4ml 或更大直径的管道)中与膜平行方向引入高速流动的液体,在管内产生湍动现象(图 3c)以减少浓度极化现象。超滤液与膜成垂直方向流出。

4. 薄层层流型

这类设备在实验室和工业生产中应用极广，还可能进一步发展。它是在很薄的管道(约 0.5mm)中与膜平行方向引入高速薄层液体流，流速可达 3—30m/sec，因此这类仪器所能处理的液体量是相当大的。被处理的溶液高速流动，超滤效果可能受到一些影响，但它流过的膜表面积比搅拌型要大得多，同时还可采用循环超滤的方法，所以在总效果上仍优于搅拌型。在处理稀溶液时，达到同样效果，其速度要比搅拌型快 2—6 倍。在处理高浓度溶液或粘性液体时，优点更加显著。属于这一类型的仪器设备有：

(1) 空心纤维型[6,7]　如 DC-30 型超滤设备，由三根套筒和其他辅助设备组成，每根套筒内由无数根空心纤维丝的超滤膜成束构成，膜表面积 $2.7m^2$，在约 3 大气压下工作

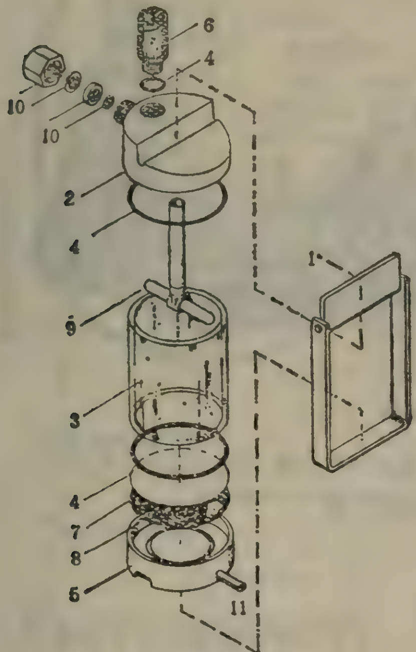


图 7　搅拌型超滤器

1——固定架；2——顶部；3——超滤杯；4——环状垫圈；5——底座；6——安全阀；7——超滤膜；8——多孔支持片；9——搅拌磁芯；10——N_2 进口装置；11——超滤液出口

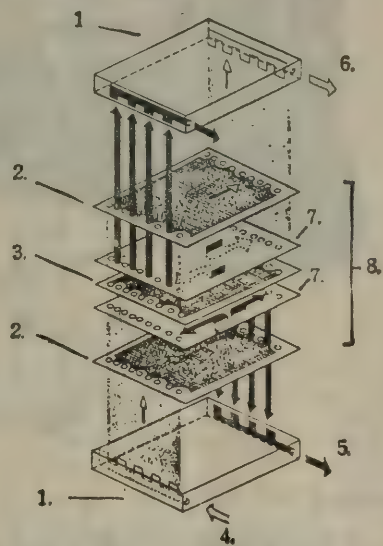


图 8　盒式超滤器示意图

1.歧管；2.截留分离筛(膜)；3.过滤分离筛(膜)；4.截留物入口；5.过滤液；6.截留物出口；7.滤膜；8.膜包

时流量达 1l/min。其优点是能在各种 pH 和高温(90℃)条件下连续工作，缺点是不适于粘性液体。目前空心纤维膜只有两种（分子量截止值分别为50000和10000）；大型的表面积达 $148m^2$，可用于生产超纯水。

目前国内已有上海医工院和上海医疗器械研究所等单位生产中空纤维型超滤器，后者商品化的铜氨中空纤维透析器表面积达 $1.2m^2$，可用环氧乙烷灭菌。

(2) 盒式超滤器　小型的可把200—3 000ml 处理到 20—30ml (Minitan)，大型的可把 5—300l 处理到最后体积200—2000ml (Pellicon)。适用于实验室大量样品的浓缩、

脱盐和细胞的洗涤，以及产物（例如抗体、干扰素）的澄清。超滤膜的分子量截止值有10 000、30 000和100 000等几种，膜的类型有纤维素型，也有聚砜型。这类盒式超滤器也可以安置0.1、0.22和0.45μm的微孔滤膜作微孔过滤器用。仪器如图8所示，从入口处(4)泵入待处理的液体，保留的物质以切向横流过滤膜包(8)，最后从歧管板流出(6)并回收到原来的样品容器中去(图中灰色流)；当液体流到膜表面时，总体积中某些特定组成流穿过膜，且被引出到歧管板外(图中黑色流)经过滤旁路而被收集分离。盒式过滤器可以只用一个滤膜包(图8中(8)和图9)，也可以把几个滤膜包串联起来使用，这样效率更高。

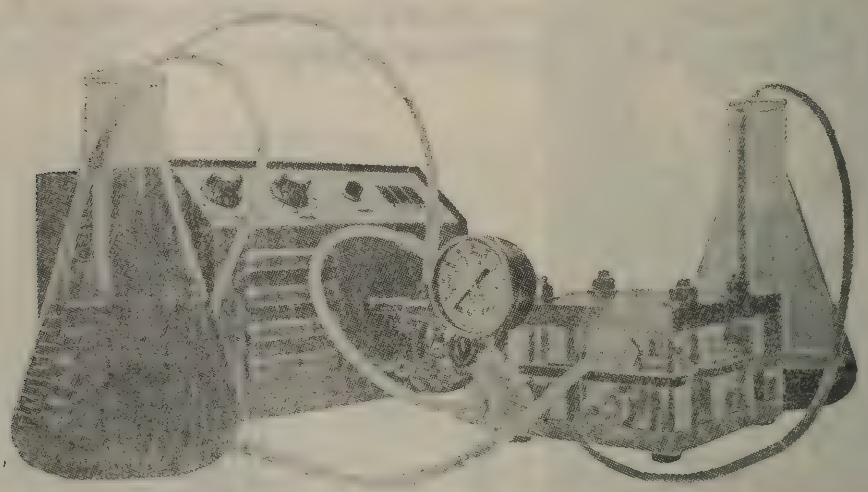


图9 盒式超滤器

三、影响超滤的因素

1. 膜的选择性

膜的选择性通常用分子量截止值来表示，即大体上能被膜保留的分子的最小分子量数值。超滤膜一般也是据此来划分级别的。但这是一个极其任意的指标。实际上，选择性和许多因素有关，主要有：(1) 溶质的分子特性，除分子的大小外，还和形状、电荷等有关。(2) 膜的特性，除保留大分子的情况和孔径外，尚有膜本身的不对称性、"皮肤层"的分布和电荷等因素。(3) 超滤的条件，例如溶质的浓度、采用的压力大小及流体动力学等方面。

PSED 超滤膜的分子量截止曲线如图10所示。一般被分离的两种物质的分子量差别在5—10倍时较为有效。因此，超滤对于脱盐或浓缩来讲是非常有效的方法。对于蛋白质或酶的分级分离，为了使效果更好，往往采用串联超滤的方法[8,9]。

2. 流速

水的通透性一般可以近似地用流速，即在一定压力条件下每分钟通过单位面积膜的液体量来表示。实验室常用 ml/cm²/min 来表示，国外工业上常用加仑/英尺²/天来表

示*。

对于各类型仪器，蒸馏水的流速和压力都成正比关系；但当有溶质存在时，甚至在相当好的搅拌条件下，也不能一直保持正比关系（图 11），并且仪器类型不同，情况也不相同。

流速和分子量截止值是两个不同的概念，二者之间不一定存在着平行关系（例如，表 1 中 Millipore 厂产品）。一般各向异性的膜流速要快得多，约 10—50 加仑/英尺²/天，而各向同性的膜流速只有 0.1—0.5 加仑/英尺²/天。

其它的因素，包括温度、时间、阴离子和阳离子等无机盐对超滤流速也有影响。例如低温操作时，比室温超滤时的流速要慢得多。流速的快慢，在一定程度上也会影响到分离的效果[10]。

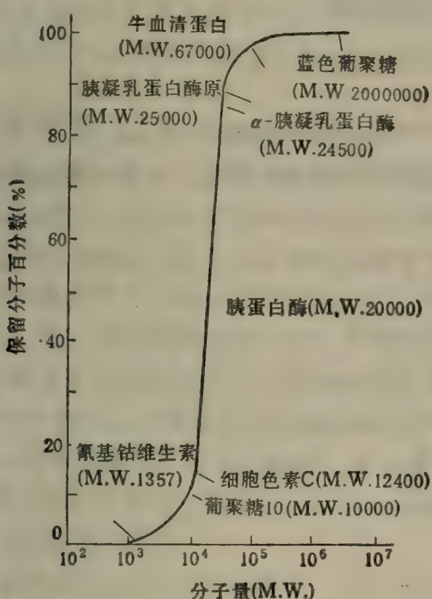


图 10　PSED 超滤膜分子量截止曲线

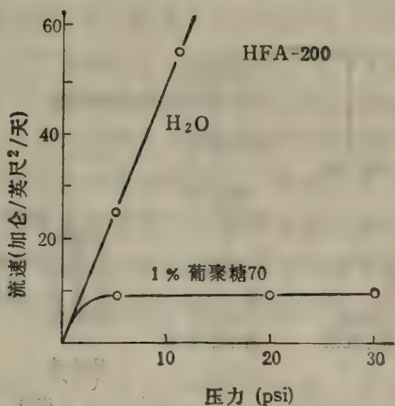


图 11　蒸馏水和 1% 葡聚糖 70（分子量 70000）在不同压力下的流速

14.70psi = 1 大气压

（注：1 加仑/英尺²/天≈40.7 升/米²/天）

3. 溶质浓度的影响

上面提到浓度极化现象会引起流速下降，它也会影响到选择性，因为溶质分子通过膜的情况也依赖于它们在膜表面的浓度。对相同浓度的溶液来讲，浓度极化现象的增强会导致通过膜的溶质量的下降。溶质在膜表面的累积，也可以看作为一层次级膜，降低了分离能力，使选择性变差，直到超过溶解度限度而出现沉淀。这种现象在各向同性的膜中更为严重，甚至会阻塞薄膜的微孔。

实验室用的超滤仪器中，常采用使溶液搅拌或震动的方法减少浓度极化，搅拌速度不

* 1 英尺=0.3048 米。1 加仑(英)=4.546092 升。

同，对超滤效果也有影响。近年来更普遍采用错流（cross-flow）方式以降低极化现象。

4. 其他

由于各种膜的组成不同，因此对溶质分子的吸附也不同，选用的膜对被超滤溶质的吸附作用应尽量地小。此外，吸附作用与选用的缓冲液或 pH 有关，例如，Diaflo UM 型膜不能在高于 0.02mol/L 的磷酸缓冲液中使用，因为组成膜的多聚物水合后能与某些离子强烈地相互作用而影响溶质的通过。

某些分子在溶液中能够以不同形式存在，设计超滤实验时，可改变 pH 或添加聚集剂使它们形成二聚体或多聚体，以便采用较大孔径的膜，增加流速。

四、 超滤的实际应用

1. 浓缩和脱盐

自从 Blatt 等人（1965）[11]开始应用超滤法于生物样品的浓缩后，Wang, D. I. C. 等也报告浓缩了几种酶和噬菌体，以后更广泛地应用于许多酶的浓缩。一般在酶的浓缩工

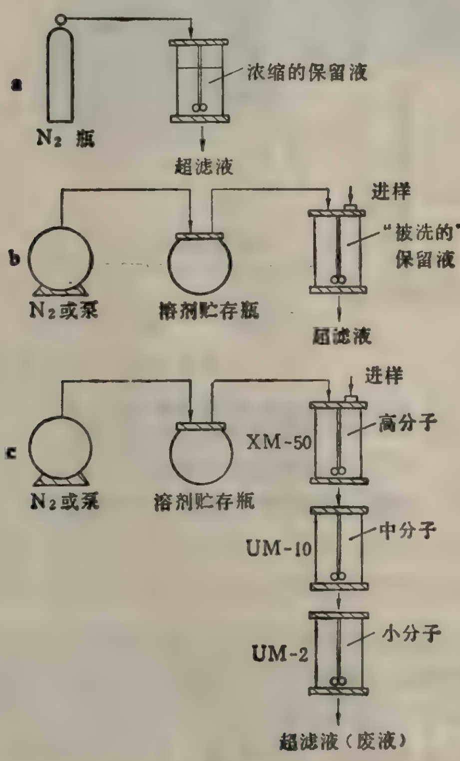


图 12　几种超滤用法

a——超滤；b——透滤；c——串联透滤

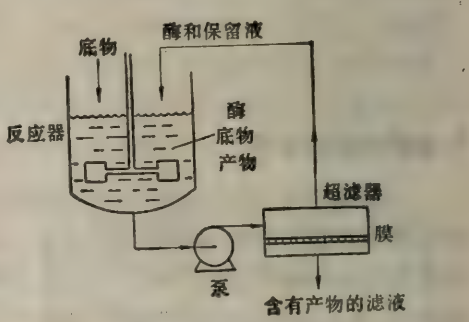


图 13　超滤和酶反应联用

作中回收率可高达90%[12]，同时除去了溶液中的盐和低分子杂质，比活有明显的提高，是一种简单和快速的浓缩方法。Bixber 比较了各种浓缩酶方法的经济价值，认为超滤最经

济。Kcay 认为在微生物酶制剂的生产中，采用超滤作为最初的工艺，能大大缩小体积，降低成本，是一种有效且有发展前途的方法。

超滤也广泛地用于酶制剂的脱盐。在超滤过程中，电解质（E）和溶液中可通过膜的溶液（PS）流出了超滤器，大分子溶质（MS）被浓缩，同时部分纯化，即 $\frac{MS}{E+PS}$ 一直在增加。而在脱盐过程中，盐可以认为是一种 PS，在简单的超滤中(图 12a)，它在滤出液和保留液中浓度是相同的，且维持恒定。为了从保留液中完全除去盐，则可采用透滤法(Diafiltration)，即在压力源和超滤器之间增加一个体积比超滤器容量大的贮存瓶(图 12 b)，瓶内贮洗涤液(水或低浓度的缓冲液)，洗涤液不断地压入超滤杯，超滤杯中的溶液体积和大分子溶质（MS）不变，而电解质和其他小分子溶质和盐等（PS）则随着洗涤液而除去，滤出液的电导迅速下降，这样能把小分子物质或盐彻底洗干净。在浓缩样品时，若样品量很大而超滤器容量较小时，也可把样品放在贮存瓶中连续进样[13,14]。

2. 分离和纯化

Wang, D. I. C. 等曾报告用超滤法纯化胰蛋白酶粗制剂。但更多的报道是把超滤和酶反应联用，这种联用是基于所利用的酶反应是把大分子多聚物水解成小分子产物，因而可选择一种膜，它能够保留底物和酶分子，而允许产物通过。这样首先可使生产过程连续，产物纯化简化；其次由于不断除去了产物，减少了逆反应，反应可保持在较高的初速度下进行；第三，酶可连续使用，减少了酶的用量，未作用的底物也能充分地利用[15](图13)。因此，酶反应和超滤结合可以降低生产成本，目前已经较为普遍的采用。例如，大豆的酶解产物分离[16]，α-胰凝乳蛋白酶水解乳清蛋白后的酶解产物分离，链霉素蛋白酶和胃蛋白酶水解水不溶性的鱼蛋白浓液，纤维素酶水解纤维素，α-淀粉酶或糖化型淀粉酶水解淀粉等；尤其是最后一种反应，用 PM-10 膜能得到非常纯的葡萄糖，并且连续工作 12 天，酶活力没有损失[6,15]。

在实际应用中，有时因酶和产物分子相近，较难分开。为了克服这个缺点，近来把酶偶联到高分子量的可溶性多聚物上去，获得了很好效果。例如胰凝乳蛋白酶结合到可溶性葡聚糖(分子量2×10^6)上[17]，它对大分子底物酪蛋白和小分子底物 ATEE 的活力分别为游离酶的 81% 和 73%，这种酶制剂的热稳定性也有很大的提高，且不易自溶。当选用 XM-100 膜来分离水解酪蛋白的产物时，20℃ 下连续工作二周，活力无损失。此法也可用于溶菌酶和一些核酸酶。

还有一种联用方法是把酶包埋到空心纤维丝的膜中，而底物分子和产物分子都能自由进出，然后进行产物和底物的分离。例如，转化酶水解蔗糖成为果糖和葡萄糖，尿酶分解尿素成为氨和二氧化碳等一类反应。

超滤除了上述一些应用外，在其他生物样品中的用途也是多种多样的。可以浓缩蛋白质、多糖、病毒，也可以从尿中浓缩蛋白激素。在纯化方面有：糖中除去蛋白质，青霉素中除去蛋白质，生物样品中除去毒素、热原或细菌，或者即所谓冷灭菌法。蛋白质混合物中的分离应用也很多，例如在结晶的 α-乳清白蛋白中分离除去白蛋白[8]。

参　考　文　献

[1] 夏其昌，超滤法及其应用，生物化学与生物物理进展，第2期，36页，1975.

[2] Chian, E. S. K. et al., Ultrafiltration of biological materials, *Process Biochem.*, 4(9), 47(1969).

[3] Blatt, W. F., Ultrafiltration for enzyme concentration, in "Method in Enzymology", 22, p. 39(1971).

[4] Charmand, S. E. and Lai, J., Comparison of ultrafiltration system for concentration of biologicals, *Biotech. Bioeng.*, 13, 185(1971).

[5] Millipore: AB-822.

[6] Porter, M. C., Application of membranes to enzyme isolation and purification, Biotech. Bioeng. Symp., No. 3, 115(1972).

[7] Altena, C. Van, Production scale ultrafiltration, *Process Biochem.*, 8(10), 7(1973).

[8] Blatt, W. F. et al., An ultrafiltration membrane for the resolution and purification of bovine alpha-lactalbumin, *Anal. Biochem.*, 18, 81(1967).

[9] Michaels, A. S., New separation technique for CPI, *Chem. Eng. Progr.*, 64(12), 31(1968).

[10] Wang, D. I. C. et al., Enzyme and bacteriophage concentration by membrane filtration, *Anal. Biochem.*, 26, 277(1968).

[11] Blatt, W. F. et al., Protein solution: Concentration by a rapid method, *Science*, 150, 224(1965).

[12] Wang, D. I. C. et al., Recovery of biological materials through ultrafiltration, *Biotech. Bioeng.*, 11, 987 (1969).

[13] Blatt, W. F. et al., Fractionation of protein solutions by membrane partition chromatography, *Nature*, 216, 511(1967).

[14] Blatt, W. F. et al., A modified ultrafiltration cell for separating the products of proteolysis, *Anal. Biochem.*, 22, 161(1968).

[15] Wang, D. I. C. et al., Biochemical engineering, *Chem. Eng.*, 76(27), 108(1969).

[16] Roozen, J. P. and Pilnik, W., Ultrafiltration controlled enzymatic degradation of soy protein, *Precess Biochem.*, 8(7), 24(1973).

[17] O'Nell, S. P. et al., An ultrafiltration-reactor system using a soluble immobilized enzyme, *Biotech. Bioeng.* 13, 319(1971).

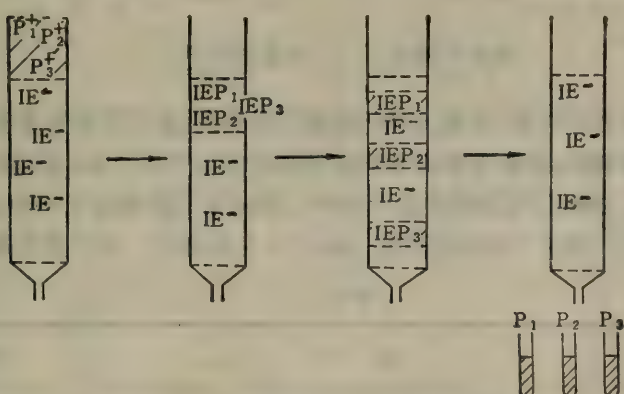
离子交换层析

陈 远 聪

（中国科学院上海生物化学研究所）

一、基本原理

蛋白质是两性分子，在水溶液中能解离而带正电荷和负电荷：分子中的氨基末端和碱性氨基酸的侧链基团，解离后带正电荷，羧基末端和酸性氨基酸的侧链基团，解离后带负电荷。各种蛋白质解离后所带电荷不尽相同，由此分酸性、碱性和中性蛋白质。由于等电点的差异，在一定 pH 值的缓冲液中的解离度就不一样。应用离子交换层析法纯化蛋白质，就是利用这些差异把它们吸附在层析柱上，用不同离子强度的缓冲液把蛋白质解析下来，按各种蛋白质吸附力的强弱而展现出不同移动速度的色层带，分部收集洗脱液，可得到较为纯净的蛋白质（图 1)。



P_1, P_2, P_3------蛋白质　IE^-——离子交换剂

图 1　离子交换柱层析分离蛋白质示意图

做离子交换层析纯化蛋白质需要考虑的问题：如要纯化的蛋白质是否适合用这种方法，就是说经过离子交换柱后会不会引起变性而丧失活性；为了使分离纯化达到最佳效果，需要选用何种离子交换剂；层析柱的大小和安装；缓冲液的选择和洗脱时的流速，洗脱液的收集、浓缩和鉴定；离子交换剂的处理和保存等。如果缺少这些知识和经验，常常难以达到纯化蛋白质的预期效果。

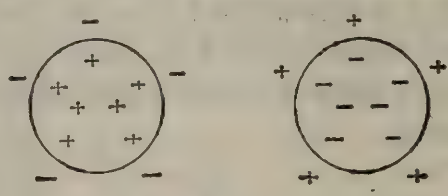
二、对要分离纯化的蛋白质的基本了解

蛋白质的生物活性取决于它的一定的空间结构，如果空间结构遭到破坏，引起了蛋白

质变性，活性就丧失。各种蛋白质的稳定度不同，变性的条件也不一样。引起变性的因素很多，如温度、pH 等。一般的蛋白质对温度十分敏感，层析最好在较低温度下进行。偏酸或偏碱下容易变性，一般适合的 pH 在6—8之间。我们曾分离一种蛋白酶，其最适 pH 为8，低于 pH6 或高于 pH9 就失活。还分离过一种金属蛋白酶，在用阴离子交换树脂时，能保持活性，当改用阳离子交换剂后，活性立即丧失，可能是阳离子交换剂从蛋白质分子中夺走了活性必需的金属的缘故。因此在进行柱层析前，先要观察在什么条件下会发生活力的变化，作为选用层析条件的参考。

三、离子交换剂

在不溶于水的基质（matrix）上共价联上能解离的基团，并与其电荷相反能移动（mobile）的离子结合，这些离子能与溶液中电荷相似的离子进行可逆的交换。根据可供交换的离子的性质把离子交换剂分为阳离子和阴离子两种类型。



阴离子交换剂　　阳离子交换剂

离子交换剂又可分为强酸、强碱、弱酸、弱碱几种类型，它们之间的差别在于联结在基质上的不同基团的解离度。强酸和强碱型交换剂能在较为广泛的 pH 范围内完全解离，相当于 pH2—10 之间。弱酸型交换剂在低于 pH6，弱碱型交换剂高于 pH9 就失去了电荷，于是失去了交换能力。因为一般蛋白质在 pH6—8 之间稳定，所以常用弱酸和弱碱型交

表 1

类　型	名　称	结 构 式
弱　酸	CM—(羧甲基,Carboxymethyl-)	$—OCH_2COO^-$
强　酸	SE—(磺乙基,Sulfoethyl-)	$—OC_2H_4SO_3^-$
	SM—(磺甲基,Sulfomethyl-)	$—OCH_2SO_3^-$
	SP—(磺丙基,Sulfopropyl-)	$—OC_3H_6SO_3^-$
	P—(磷酸,Phospho-)	$—OPO_4H_2^-$
弱　碱	DEAE—(二乙基胺乙基,Diethylaminoethyl-)	$—OC_2H_4N^+(C_2H_5)_2$
	AE—(氨乙基,Aminoethyl-)	$—OC_2H_4NH_3^+$
强　碱	QAE—(季胺乙基,Quarternary-)	$—OC_2H_4—N^+(C_2H_5)_3$

换剂。目前交换剂的基质的种类较多。早期的用于分离氨基酸和其他小分子物质的离子交换树脂的基质是聚苯乙烯类，由于具有强的疏水性、容易引起蛋白质变性；另一方面由

于其交联度大、孔径小、蛋白质只能吸附于基质的表面，故交换容量小，实践证明，不适于蛋白质纯化。60年后发展起来的离子交换剂，是亲水性的基质，由糖链组成，如纤维素型，葡聚糖凝胶（Sephadex）型，琼脂糖（Sepharose）型，球状纤维素（Sephacel）型等。合成时，控制其交联度，得到不同孔径的基质，如25、50和CL-2B、CL-6B等。在基质上联结的基团有下列各种类型，如表1。商品名冠以C的，如C-25或C-50，为阳离子（cation）交换剂，冠以A的为阴离子（anion）交换剂。这些类型的交换剂能很好保持蛋白质的活性，得到广泛应用。以上几种类型的性能比较，分辨能力好的以Sepharose和Sephacel，唯价格昂贵。纤维素型的价廉，适于初分和大量制备。Sephadex的50型的体积随缓冲液的pH和盐浓度改变，涨缩很大，常常会把层析柱的滤板堵塞，影响分离效果。

四、交换容量

离子交换剂容量是其能提供交换离子的量度，是分离纯化时选用交换剂数量的重要参考数据。交换容量即总交换容量或有效交换容量（available capacity）。表2列出各种离子交换剂的交换容量。

表2 离子交换剂的交换容量

交换剂		总交换容量	
基质	交换基团	meq/g	meq/100ml
纤维素	CM-	0.7	
	SE-	0.5	
	磷酸-	1.3—2.6	
	DEAE-	0.8	
	AE-	0.6	
Sephadex	DEAE-		
	A-25	3.5	50
	A-50		17.5
	QAE-		
	A-25	3.0	50
	A-50		10
	CM-		
	C-25	4.5	56
	C-50		17
	SP-		
	C-25	2.3	30
	C-50		9
Sepharose	DEAE-		15
	CL-6B		
	CM-		
	CL-6B		12
Sephacel	DEAE-	1.4	17

交换容量的测定是用 1g 交换剂干粉，用酸或碱定量滴定的 mg 当量数。阳离子交换剂用盐酸处理后，无离子水洗至接近中性，在 1mol/L KCl 溶液中，用稀碱溶液滴定，而阴离子交换剂用相反的方法测定。在实际应用时，离子交换剂的用量大大超过从上述交换容量的计算值，是由于交换容量受到实验条件的影响，如样品与交换剂的基团可接近的程度，洗脱液的浓度与离子强度，互相交换离子的性质等因素而改变了交换容量。

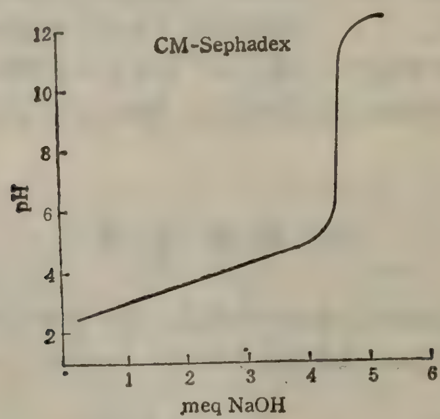


图 2　CM-Sephadex 交换容量的测定，于 1mol/L KCl 溶液中滴定曲线

五、交换剂的处理，再生和保存

离子交换纤维素常含细颗粒，会堵塞层析柱的滤板，需经浮选除去。浮选方法是，先经充分溶胀后，在大烧杯里用蒸馏水调成稀薄的悬浮液，静置 1 至 2 小时，倾去上层混浊液，如此反复多次，直至上清液澄清为止。Sephadex，Sepharose 等系球形颗粒，无须经过浮选，直接用缓冲液平衡，即可装柱。

离子交换剂的价格较贵，每次用后只须再生处理，能反复使用多次。处理方法是交替用酸、碱处理，最后用水洗至接近中性。阳离子交换剂最后为 Na 型，阴离子交换剂为 Cl 型，是最稳定型式。如果分别处理呈 H 型和 OH 型，则不稳定，交换基团容易脱落，交换剂的颜色变黄，容量降低。故处理的顺序分别为，阳离子交换剂是，酸→水→碱→水，阴离子交换剂是，碱→水→酸→水。由于上述交换剂都是糖链结构，容易水解破坏，须避免强酸、强碱长时间浸泡和高温处理。其再生条件如表 3。

表 3

剂　型	处理用的酸碱浓度	浸泡时间
纤维素	0.5mol/L HCl 或 NaOH 加 1mol/L NaCl	3—4小时
Sephadex	0.1mol/L HCl 或 NaOH	半小时
Sepharose	1mol/L 醋酸钠，pH3.0 或 0.1mol/L NaOH	

离子交换剂容易长霉引起变质，不用时，需洗涤干净，加防腐剂置冰箱内保存。常用

加 0.02% 的叠氮钠防腐，叠氮钠遇酸放出有毒气体，也是剧毒易爆炸的危险品，使用时要倍加小心。Pharmacia 产品使用的防腐剂如表 4。有人也用高浓度的有机溶剂作防腐剂，

表 4

剂　型	溶液的 pH	防腐剂及其浓度
阴离子交换剂	弱碱性	Phenyl mercurie salt 0.001% Chlorohexidine (Hibitane) 0.002%
阳离子交换剂	弱酸性	Ethyl mercuric thiosalicylate (Merthiolate, Thimersal) 0.005%
阴、阳离子交换剂	弱酸性	Trichlorobutanol (Cheoretone) 0.05%

如 95% 酒精。我们发现在重新使用时，有机溶剂难以一下子除尽，对交换容量有影响。

六、层析柱

离子交换用层析柱，一般粗而短，不宜过长，除非分离较为复杂的蛋白质混合物时，可以长些。根据分离样品量选用合适的层析柱，一般其直径与柱长比约在 1 比 10 或 1 比 20 之间，较长的可达 1 比 50。柱必需笔直而均匀。柱的安装要垂直，必要时用铅垂线校正。将离子交换剂悬浮在平衡缓冲液中，配成较为稀薄的混悬浮液，上层液的体积不得少于四分之一。如果用过稠的悬浮液，层析柱装填就不够均匀。装填前先需真空抽气除去吸附于交换剂表面上的气泡，抽气不得少于 10 分钟。夹住层析柱的出口，摇匀悬浮液，倒入柱内，待层析柱滤板上沉积约数厘米较粗颗粒后，再开启出口，让液体流出，不断添加悬浮液，使层析柱装填平整均匀。用手电筒对着光线照以检查装填的状况，如柱内有气泡或断层，需倾出重装。层析柱出口处的空泡（dead space）须低于柱体积的 0.1%，装柱前用平衡液把出口处的气泡全部赶出，这样可以避免分离后的色带被稀释和再混合。这类特制的层析柱，上海锦华实验器械厂已有产品供应。

七、洗脱缓冲液

洗脱层析柱的缓冲液，常用缓冲能力较强的，如 Tris-HCl，磷酸盐、醋酸和醋酸钠缓冲液等。对于分离未知等电点的蛋白质样品，可先用试管内试验，以确定最适平衡缓冲液的 pH。如图 3 所示。

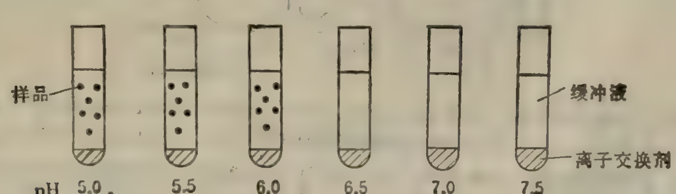


图 3

上列各试管中,各加入等量的离子交换剂约 100mg 和相差 0.5pH 的系列缓冲液,对阴离子交换剂选用 pH5—9,阳离子交换剂选用 pH4—8,先用体积为交换剂的 10 倍,浓度为 0.5mol/L 的缓冲液平衡。摇匀,放置. 吸出上清液,再用浓度为 0.01—0.05mol/L 的平衡液反复处理 5 次。然后每管中加入等量样品,摇匀,放置 10 分钟,检测上清液的样品含量。图 3 显示在 pH6.0—6.5 之间样品被完全吸附,可选择 pH6.5 为初始平衡缓冲的 pH。如果选用平衡缓冲液 pH 偏高或偏低时,由于要分离的蛋白质吸附太牢,往往因洗脱液需用高盐浓度或比较剧烈的条件才能从层析柱上解析下来而带来麻烦。

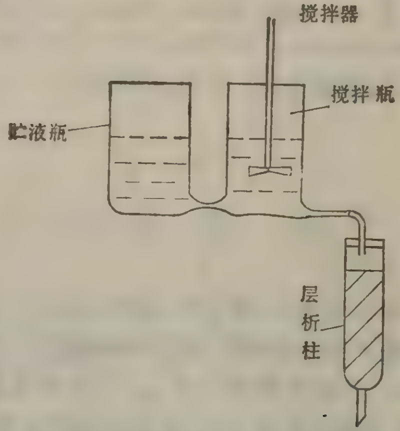


图 4　图中搅拌瓶中接搅拌器,下部与贮液瓶有一小孔联通,两瓶内所贮的液面高度相齐。安装时,需仔细把联通管中的气泡排除,并夹住,避免不同浓度的缓冲液混合。洗脱开始后,才把联通管打开,并开始搅拌。

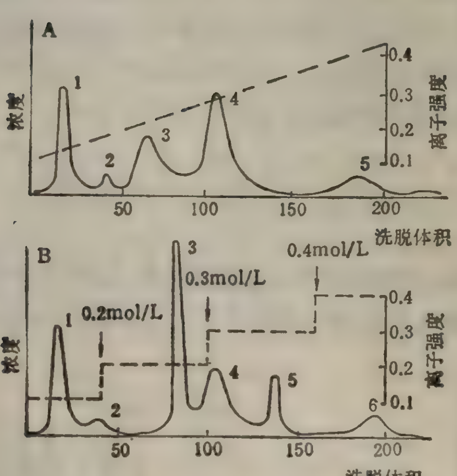


图 5　牛血清的分离,QAE-Sephadex A-50,层析柱 1.5×26cm 样品: 4mg 3% 牛血清冻干粉(W/V)

A. 直线梯度洗脱,0.1mol/L Tris-HCl 缓冲液,NaCl 连续梯度 0→0.5 mol/L NaCl　B. 同一缓冲液,NaCl 浓度由 0.1→0.2→0.3→0.4mol/L NaCl 的分级洗脱。B 中峰 4 和 5 为血清白蛋白,相当于 A 中峰4。

洗脱是把层析柱上吸附的蛋白质解析下来，常用增加盐浓度或改变 pH 两种方式。因为考虑到蛋白质的稳定性，一般常用增加盐浓度洗脱，不会产生引起蛋白质变性的危险。其方式又可分为直线梯度（linear gradient）和分级梯度（stepwise gradient），此外还有凹状梯度（concave gradient）和凸状梯度（convex gradient）等。后两种方式较少应用。直线梯度法需要一个梯度装置，即由一个盛放低离子强度溶液的搅拌瓶，一边联结在层析柱上，另一边与盛放高离子强度的贮液联结而成，如图 4。

直线梯度的离子强度变化呈直线关系，其分辨效果较好。而分级洗脱，由于变化呈阶梯式，常常会把已分开的色层带挤在一起被洗脱下来，有时也会把一条色层带分成两条而出现假象，分辨力较差。但作为初步摸索时，可以很快找到所需要分离的蛋白质能在某种离子强度的缓冲液洗下来的条件，以便进一步选择合适离子强度的直线梯度缓冲系统时参考。分级洗脱的装置很简单，只需把层析柱与一个贮液瓶联结，洗脱时，瓶内的缓冲液由低离子强度到高离子强度，以相隔一定体积连续更换。图 5 为两种洗脱方式的比较。

八、洗脱液的流速

洗脱液的流速快慢影响色层带的分离效果，一般来说慢比快的效果好，但太慢也有分离时间长，色带扩散等不利因素。究竟柱层析选用多大流速最好，要根据具体情况而定，如层析柱的容量大小，交换剂的性能，如强度（即涨缩性），孔径大小多少，颗粒度等都有关。选择流速常常带很大的经验性，没有具体的规范化。图 6 比较两种流速的分离效果。图示 B 较 A 的分辨力差。流速的表示法，常用 ml/h、也有用 cm/h 表示，但因需有流量计测量，比较少用。

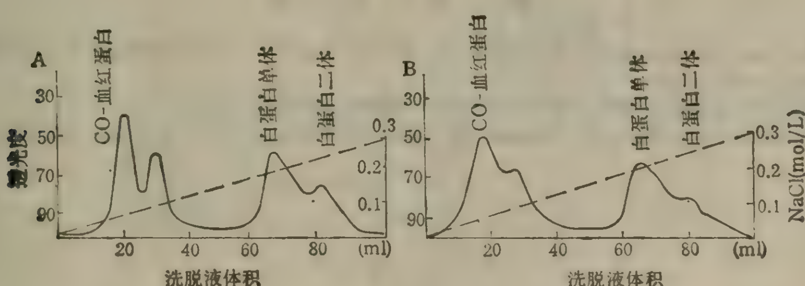


图6　两种洗脱液流速的比较，血红蛋白与白蛋白的分离图谱
A. 流速8ml/h；　B. 流速20ml/h。
DEAE-Sephadex A50，洗脱液，0.1mol/L Tris-HCl，pH8.3。

九、样 品 液

离子交换层析对样品液的体积要求不如凝胶过滤层析严格，后者的上样体积愈小，分离效果愈好。对离子交换层析的样品液的离子强度和 pH 的要求严格，否则分离效果不好；其体积稍大些无关紧要，一般限制在柱床体积的 1—5% 为宜。为了保证全部样品吸

附在柱的上层，阳离子交换层析的样品液的 pH 值以比平衡缓冲液低一个 pH 单位为宜；对阴离子交换层析可高一个 pH 单位为宜。上样品时，要保持上层表面的平整，防止气泡进入表层。加样品液要紧靠表层的柱壁绕壁缓慢加入，待样品液进入柱内后，用少量平衡缓冲液洗壁二次，进入柱后，再加足缓冲液开始洗脱。

十、浓缩和去盐

离子交换层析的收集液，含大量的无机盐，体积也较大，需要浓缩和去盐，才能得到产品。浓缩的方法有很多种，如超滤、透析，硫酸铵沉淀，Sephadex 或右旋糖酐（Dextran）脱水处理等。国内已生产各种类型的超滤器和超滤膜，可用于浓缩，但有时也会发现蛋白质漏失或变性。在选择何种方法时，需经初步试验，找到理想的方法。得到的产物，如果冻干后不会失活，以冻干后低温保存为宜。

十一、结　　语

离子交换层析是目前纯化蛋白质常用的重要方法。由于从生物材料中有种类繁多的蛋白质，经过一次离子交换层析就达到高纯度的例子并不多，需要与其他纯化蛋白质方法配合，才能达到预期的效果。如用经典的方法，如盐析，分部沉淀，有机溶剂抽提，调节 pH 沉淀等初步纯化后，再经亲和层析，凝胶过滤等方法精制，离子交换层析从利用其带电荷性质的差异发挥其专长，就能取得理想的效果。即使离子交换层析本身，有时也须改换层析条件或重层析才能使分离的蛋白质达到高纯度。

参　考　文　献

[1] Ion Exchange Chromatography, Principles and Methods. Pharmacia Fine Chemicals, Printed in Sweden by Rahms i Lund (1980).

[2] 陶慰孙、李惟、姜涌明、罗贵民、林永齐，《蛋白质分子基础》，高等教育出版社，1981.

[3] Bikales, N. M. and Segal, L., Cellulose and Cellulose Derivatives, Wiley and Sons Inc. (1971).

疏 水 层 析

屈 贤 铭

（中国科学院上海生物化学研究所）

一、基 本 原 理

蛋白质分子上有疏水区，它们主要由酪氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、苯丙氨酸等非极性的侧链密集一起形成，并暴露于分子的表面。但不同蛋白质分子的疏水区强弱有较大差异。疏水层析技术的基本材料是在不带电荷的载体上偶联疏水基团而成的疏水吸附剂。根据这些疏水基团和蛋白质疏水区间相互作用的强弱，可以达到分离的目的。

疏水层析的分离效果依赖于系统中的三个主要组成成分之间的相互作用：即疏水吸附剂、溶剂水、和带部分疏水性质的溶质（生物大分子），见图1。溶质和疏水吸附剂之间相互作用的强度依赖于溶质和偶联在载体上疏水基团的疏水性，及它们和溶剂水的相互作用。任何微小的扰动，如温度、pH、离子强度等变化都会影响到这三种组分中的一种或多种，都将可能影响疏水层析的分离效果[1]。这就使实验设计和选择洗脱条件具有较大的弹性，也使疏水层析成为适用于多方面应用的技术。

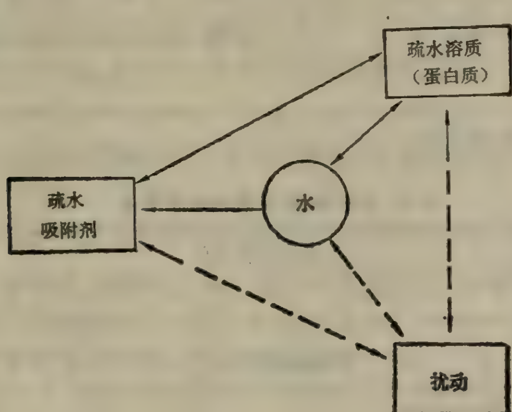


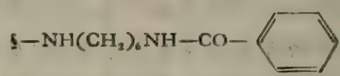
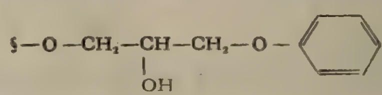
图 1　吸附剂蛋白质样品分子（疏水溶质）和溶剂水在疏水层析中相互作用，改变这三种组分的一种或多种都可能影响分离效果

二、疏水吸附剂的制备及商品疏水吸附剂

疏水吸附剂一般以琼脂糖凝胶或交联琼脂糖凝胶为载体，经溴化氰活化后再偶联上单或双氨基链烷[2,3]，见表 1 中的 I、II、III。瑞典 Phamacia 公司有辛基交联琼脂糖 4B

(Octyl-Sepharose CL-4B) 和苯基交联琼脂糖凝胶 4B (Phenyl-Sepharose CL-4B) 商品出售，能满足一般使用的要求。表 1 中的 IV 和 V 是这两种疏水吸附剂的部分结构。由于这两种吸附剂的载体是交联琼脂糖。所以有很高的化学与物理稳定性。 它们能抗尿素、氯化胍等变性剂。吸附剂里的水被有机溶剂置换也不影响凝胶的结构，对离子型或非离子型的去垢剂也是稳定的。 两种吸附剂偶联上的配基浓度大约 40μmol/ml 沉降后凝胶体积。 其取代程度相当于每 mol 半乳糖上大约有 0.2mol 的疏水取代基。 吸附剂的结合容量视实验条件及蛋白质性质而有所不同。在含有 1 mol 硫酸铵的 0.01mol pH6.8 磷酸缓冲液中这两种吸附剂每 ml 胶可结合大约 15—20mg 人血清白蛋白或 3—5mg β-乳球蛋白。这两种吸附剂应该以悬浮状态保存。虽然凝胶本身具有抗生物降解的能力，但由于在悬浮液的基质中特别有磷酸根离子的存在下，微生物很容易生长，因此通常悬浮液中加些叠氮钠(0.02%)以防微生物生长。并且应该贮存在低于 8℃ 的冰箱中， 但切不可冻结。

表 1 常见的一些合成疏水层析吸附剂

编 号	结 构
I	
II	§$-NH(CH_2)_5CH_3$
III	§$-NH(CH_2)_7CH_3$
IV	§$-O-CH_2-CH(OH)-CH_2-O-(CH_2)_7-CH_3$
V	

§ 代表琼脂糖凝胶或交联琼脂糖凝胶

表 2 疏水相互作用的离子效应

←—增加盐析效应

阴离子 PO_4^{3-}, SO_4^{2-}, $CH_3.COO^-$, Cl^-, Br^-, NO_3^-, ClO_4^-, I^-, SCN^-

阳离子 NH_4^+, Rb^+, K^+, Na^+, Cs^+, Li^+, Mg^{2+}, Ca^{2+}, Ba^{2+}

增加减极效应—→

三、吸附、洗脱和吸附剂的再生

吸附生物大分子采用柱层析法，装柱和拆柱和其他类型的柱层析法相同。将吸附剂装填柱内后(最好先用水泵减压抽去气泡)，用样品缓冲液充分平衡吸附剂，再将样品溶液在一定条件下过柱。为了使要分离的生物大分子能紧密地结合在柱上，适当选择缓冲液的性质，pH 和离子强度，同时也要考虑温度的因素，洗脱缓冲液的选择对有效的分离更具

有重要性。

加入中性盐能使溶液的离子强度增大,可增强疏水作用的强度。一般来说,用疏水层析方法分离生物大分子,为使所要分离的物质吸附到吸附剂上,在样品溶液中加入较高的盐浓度(如 4mol 浓度的氯化钠溶液)。不同的盐对促进疏水作用的效应根据它们的离子性质是不同的。表 2 给出几种常用阴离子和阳离子增强疏水效应(盐析效应 salting out effect)或降低疏水作用强度(减极效应 chaotropic effect)的级序。

为有效地洗脱吸附在吸附剂上的生物高分子达到分离的目的。可根据这些物质与吸附剂的不同疏水作用强度来改变洗脱条件,以达到选择性的解吸附,这可以用下列方法中的一种或几种改变洗脱液来实现。

1. 变换一种具有较低盐析效应的离子,参看表 2。

2. 降低离子强度。

3. 减弱洗脱剂的极性,可参看表 2。也可加入乙二醇。

4. 含有去垢剂的洗脱剂。

5. 增高洗脱剂的 pH 值。

吸附剂的再生:每次实验结束后,吸附剂需要再生。因为吸附剂中尚留有结合得非常紧密的生物高分子,去垢剂等。未经再生的疏水吸附剂,其吸附容量将明显降低,甚至一点也不能吸附物质。一般来说,吸附剂经过再生可以反复使用。资料中曾有报道再生过程可以在层析柱中进行。但根据我们的经验,在层析柱中进行再生的吸附剂柱很容易"出花"、"断裂"。为免遭整个实验失败,还是在烧杯中再生为好。从柱中取出的吸附剂通常用各种溶剂在烧杯中悬浮,再用沙芯漏斗吸滤;每换一次洗涤溶剂,再如此操作一遍。再生过的吸附剂在重新装柱前,需减压抽去溶解在液体中的气体,以免柱装好后因温度变化或洗脱剂的变换而出现气泡,使柱"出花"或"断裂"。具体过程可用下列溶剂依次洗涤。

1. 用蒸馏水洗涤二次以上;2. 用乙醇洗一次;3. 用正丁醇洗二次;4. 用乙醇洗一次;5. 用蒸馏水洗一次,减压除气泡,装柱;6. 用初始缓冲液平衡吸附剂,为下次实验作好准备。

四、辛基交联琼脂糖 4B 和苯基交联琼脂糖 4B 应用举例

辛基交联琼脂糖 4B:蛋白质的纯化,通常是在组织匀浆后用硫酸铵分级沉淀。高浓度的硫酸铵能非常有效地促进疏水作用。因而分级后得到所需的级分就可直接加到疏水吸附剂柱上进行疏水层析分离。

图 2 给出从大麦粉抽提液用辛基交联琼脂糖 4B 疏水层析纯化 β-淀粉酶的一个实验。样品在 0.01mol/L 磷酸缓冲液 pH6.8 中含有 0.25 饱和度的硫酸铵,这一浓度略低于使 β-淀粉酶沉淀的浓度。将其加到柱上后,未结合的蛋白质用样品缓冲液[即 0.01 mol/L 磷酸缓冲液(pH6.8)中含 0.25 饱和度的硫酸铵]从柱上洗去。然后,吸附的蛋白质用降低硫酸铵浓度并增加乙二醇浓度的梯度洗脱(最终浓度分别为 0% 和50%)。洗脱图谱呈现一个酶活力峰,已纯化了约 14 倍。若不加减极性剂乙二醇,仅用降低硫酸铵浓度梯度洗脱,酶的洗脱滞后,纯化程度不及在洗脱液中有乙二醇者。

苯基交联琼脂糖 4B:具有强疏水性的蛋白质可能在辛基交联琼脂糖 4B 上结合得很牢。解吸这种蛋白质所用的洗脱条件往往会使蛋白质变性。试以三种蛋白质:细胞色素

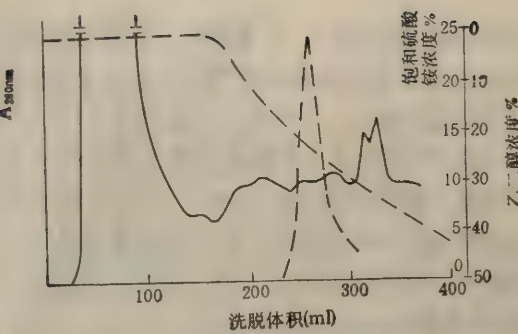


图 2 用辛基交联琼脂糖 4B

疏水层析纯化大麦 β-淀粉酶：40ml 0.01mol/L磷酸缓冲液(pH6.8)中含有0.25饱和度的硫酸铵的大麦抽提液柱的床体积30ml流速25ml/h，样品加入后用85ml 样品缓冲液洗涤。然后，用降低硫酸铵浓度并增加乙二醇浓度梯度洗脱(最终浓度分别为0%和5%)。实线是蛋白质的洗脱峰，酶活力以虚线峰标出。

C、β-乳球蛋白和血红蛋白为例。在最适条件下，疏水性相对低的细胞色素C呈强烈地滞留在辛基交联琼脂糖 4B 柱上，但还可解吸出来。其他两种更强疏水性的蛋白质根本不能从柱上解吸。此时如用苯基交联琼脂糖 4B 能将它们很好地分离。因此强疏水性蛋白质宜用苯基交联琼脂糖 4B。

苯基交联琼脂糖 4B 上苯基的疏水性，界于直链的正丁基和正戊基之间。对于蛋白质上的苯基和酪氨酰基亦可能显示出更加专一的芳基性相互作用(π-π 相互作用)，这可说明在特定例子中的分离作用。图 3 是大麦 β-淀粉酶在苯基交联琼脂糖 4B 上的层析结果。所用的实验条件和图 2 一样，但从图谱上看 β-淀粉酶活性的洗脱要延后得多，这说明有一些特殊的相互作用发生，很可能由于载体上苯基的芳基性所为。

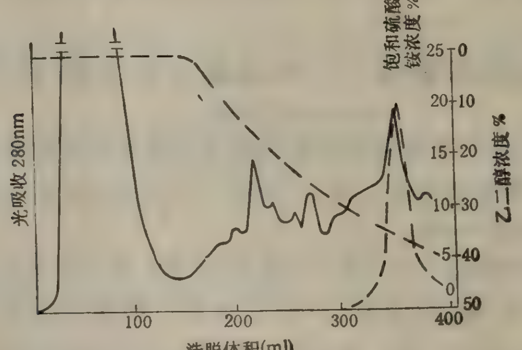


图 3 用苯基交联琼脂糖 4B 疏水层析纯化大麦 β-淀粉酶

实验条件同图 2。

我们的经验也发现辛基交联琼脂糖 4B 与苯基交联琼脂糖 4B 的疏水性有较明显的差别。在纯化柞蚕蛹血淋巴杀菌肽D的过程中，样品经葡聚糖凝胶 G-100 过滤，两次羧甲基琼脂糖柱层析分离，再经沸水浴加热 30 分钟，离心后的上清液中加甲酸铵到 2 摩尔浓度。若将此样品加到辛基交联琼脂糖 4B 柱中，很难使杀菌肽D在不变性条件下解吸

出来。但将此样品在苯基交联琼脂糖 4B 柱中进行疏水层析，以降低洗脱液的离子强度进行解吸，可以达到很有效的分离，得到聚丙烯酰胺凝胶电泳单一区带的杀菌肽[4]。

五、疏水层析吸附剂其他方面应用的举例

1. 作为固相酶的载体

有些具有非常强疏水性质的酶可以很牢固地被吸附在疏水吸附剂上，特别是辛基交联琼脂糖 4B。这类吸附剂能作为可逆转的固定化酶载体制成酶反应器。由于这种固定化并非共价键结合，因此当这种酶反应器使用过久，酶已失活，便可将这部分老酶洗去，再固定新鲜的酶达到重复使用。Hjertéy[5] 等人曾用辛基交联琼脂糖 4B 固定化了大肠杆菌 β-半乳糖苷酶，经过几星期的使用酶的活力仍然保留。

2. 作为"去垢剂交换层析"[6]

在研究内膜蛋白质时经常需要变换不同的去垢剂。例如提纯内膜蛋白质细胞色素 C 氧化酶常常要变换去垢剂胆酸盐、脱氧胆酸盐、Triton X-100、Nonide P-40、lauryl maltoside、Tween 20、Tween 80 或 Brij 96。变换不同类型的去垢剂，可用苯基交联琼脂糖 4B 来完成，就像用 Dowex 1 氯型或醋酸型树脂去交换阴离子或 Dowex50 钠型或钾型去交换阳离子一样方便，且回收率也高。由于其方法类似于离子交换层析，因此 Robinson 等人把这种方法称之谓去垢剂交换层析 (detergent-exchange chromatography)。在实验步骤设计时要注意下列三点:

(1) 用需要的去垢剂平衡疏水吸附剂，此去垢剂可交换出已和蛋白质结合的原先的去垢剂。

(2) 为避免膜蛋白的凝集或沉淀，所用去垢剂的浓度要高于各自去垢剂的临界胶束浓度(critical micelle concentration)。

(3) 为使蛋白质和吸附剂结合得最小，应该用相当高的 pH(9.0)，低离子强度(0.01)的去垢剂溶液预先饱和疏水吸附剂。上面三个步骤的条件都已满足和完成后就可开始交换另一类型去垢剂的层析。

参　考　文　献

[1] Hjerten, S., Hydrophobic Interaction Chromatography of Proteins on Neutral Adsorbents, In "Methods of Protein Separation", N. Catsimpools. Ed., Vol. 11, 1976.

[2] 余微明、邱雪贞、屈贤铭、陈峰，浙江产眼镜蛇蛇毒胆碱酯酶的研究: III. 酶的疏水层析行为，动物学研究，4, 255—259, 1983.

[3] Axen, R., Porath, J., Ernback, S., Chemical Coupling of Peptides to Polysaccharide by Means of Cyanogen Halides, *Nature*, 214, 1302—1304, 1967.

[4] Xian-ming, Qu (屈贤铭), Hakan Steiner, Ake Engstrom, Hans Bennich and Hans Boman, Insect Immunity: Isolation and Structure of Cecropins B and D from Pupae of the Chinese Oak Silk Moth *Antheraea Pernyi*, *Eur. J. Biochem.*, 127, 219—224, 1982.

[5] Hjerten, S., Rosengren, J., Pahlmans, S., Hydrophobic interaction Chromatography: The Synthesis and Use of Some Alkyl and Aryl Derivative of Agarose, *J. Chromatogr.*, 101, 281—288, 1974.

[6] Neal, C., et al., Phenyl-Sepharose-Mediated of Detergents Bound to Membrane Proteins, *Biochem.*, 23, 6121—6126, 1984.

蛋白质亲和层析技术

王 克 夷

(中国科学院上海生物化学研究所)

蛋白质的分离纯化方法近 20 年来取得很大进展，其中尤以亲和层析引人注目，已有大量文献和一些专著[1,2]。

蛋白质亲和层析的一般过程是，在一种固相载体上接有某种基团或某种分子作为配基，固定化的配基装成层析柱，经平衡后，将一多种蛋白质的混合物通过之，用平衡液洗去杂蛋白质，只有能和配基作用的蛋白质，因非共价作用(有时也可以是共价键)被吸附在柱上，最后用适当的试剂将被吸附的蛋白质洗脱下来。经这一层析过程，所需的蛋白质可以被纯化几十倍，乃至上千倍。亲和层析使蛋白质分离纯化过程大为简化，从而提高了被分蛋白质的得率。最突出的例子是血液中维生素 B_{12} 结合蛋白的分离。这一蛋白质在血清蛋白质中的含量只有一千万分之五，要分离纯化这样微量的蛋白质极为困难，不仅步骤多，而且产率低，然而使用亲和层析法则得到令人满意的结果[3]。亲和层析还有另外两个很多方法无法比拟的优点：一是，可把具有活性的成分和其失活状态分开；另一是，能从较

表 1 蛋白质亲和层析的分类

依据	被分物质的特异组成或性质	亲和吸附剂上的配基	常用的洗脱条件(3)
基于特殊化学组分或结构	游离巯基	游离巯基	加有还原剂的巯基试剂
	顺式邻位羟基	硼酸基团	改变 pH，通常降低 pH
	金属	亚氨基二乙酸	EDTA，或改变 pH 或加大离子强度
	二核苷酸类辅基等	具有一定结构的染料(1)	低浓度的辅酶，或改变 pH 等
	糖蛋白，糖肽	外源凝集素	半抗原糖类，低 pH
	氨基或羧基	羧基或氨基(2)	改变 pH 或加大离子强度
基于生物分子的特异活性	酶及其蛋白质类抑制剂	相应底物、抑制剂、辅酶或酶	专一的小分子化合物(如底物)，改变 pH
	抗体等免疫活性物质	相应抗原或有关的免疫活性剂	pH2 的酸，pH10.5 的有机胺或 3mol/L NaSCN 溶液或半抗原
	(作为抗原的)蛋白质	其诱导产生的抗体	
	外源凝集素	其专一作用的糖类	半抗原糖类，低 pH
	维生素或激素的结合蛋白	与了结合的维生素或激素	高浓度的脲或盐酸胍或小分子配基
	受体	与之作用的配基	

(1) 在一定程度上可视为疏水层析。(2) 通常这类层析被称为离子交换层析。就其本质而言，和上面几种层析完全相同。(3)亲和层析的洗脱条件，原则上是先用专一的小分子配基，如小分子配基不易得到，或被分物质强烈吸附在柱上，则再选用改变 pH，增加离子强度，高浓度变性剂等。

纯的样品中除去通常方法难以去除的少量杂质，有人称之为反亲和层析。

蛋白质的亲和层析大致可以分为两大类：一类是基于被分离物质中含有特殊的组分，例如游离巯基、金属或辅酶 I、II 等；另一类则是以它们的生物活性为依据。详见表 1。

表 2　亲和层析中常用的载体及其活化和偶联方法

载体种类		活化方法	偶联方法
大类	具体实例		
多糖类	(1) 交联琼脂糖 (2) 交联葡聚糖 (3) 淀粉 (4) 纤维素	(1) 溴化氰活化	碱性条件下和氨基反应
		(2) 过碘酸氧化生成醛基	还原剂存在下和胺、肼类化合物反应
		(3) 双功能团交联剂：双环氧化合物，环氧氯丙烷，戊二醛，双乙烯砜，SESA*	
合成高聚物	聚丙烯酰胺	肼处理后叠氮化	与胺类反应
		双功能团试剂：戊二醛交联	
多孔玻璃	硼硅玻璃	用带有功能团的有机硅	根据所接有的功能团的性质进行偶联

* SESA 为 β-硫酸酯乙砜基苯胺

亲和层析中最关键的物质是具有亲和活性的载体。表 2 则列举了几种目前最常用的载体、它们的活化方法以及和配基偶联的方法。人们还常用一些具有一定长度的双功能团化合物作为间隔物(俗称“手臂”)插在载体和配基之间，以期减小因载体和配基过于靠近而造成的空间位阻现象。

下面举几个实例。而且主要是表 1 中的后一大类。

一、豌豆凝集素的分离

凝集素是自然界中广泛存在的一大类能和糖类专一结合的蛋白质。目前分离纯化凝集素最常用的方法之一就是亲和层析。天然存在的一些多糖经交联，就可用作很多凝集素亲和层析的吸附剂。今以豌豆凝集素的分离为例[4]。

1. 分离过程

2kg 豌豆经组织捣碎机打碎后，用 8 升水在 4℃ 搅拌抽提 3 小时。除去残渣，用 5mol/L HCl 调节抽提液的 pH 至 4.6，产生的沉淀经 1500×g 离心 30 分钟除去。加入固体硫酸铵，至 60% 饱和度，3000×g 离心 30 分钟。收集蛋白质沉淀，并用 800 毫升水溶解。4℃ 下对 10mmol/L、pH7.2 的含 0.15mol/L NaCl 的磷酸缓冲液充分透析。3000×g 离心 30 分钟，清液即是所需的粗产品。

交联葡聚糖凝胶 G-100 柱 (4 × 55cm) 用 2.5 升上述磷酸缓冲液平衡，流速为 1ml/min。粗产品上柱后，用平衡液充分洗涤，除去未被吸附的杂蛋白质。至洗涤液的 OD_{280} 小于 0.05，改用 0.2mol/L 葡萄糖溶液(用平衡液配制)洗脱，即可得基本上纯的豌豆凝集素，产率为 650mg/kg。所得的产品经 DEAE 纤维素柱层析可得 A 和 B 两种同功凝集素，其中 B 约占 75%，其余为 A 成分。

2 说明

目前很多对甘露糖或葡萄糖专一的凝集素常用与上述过程大同小异的方法来分离。对半乳糖专一的凝集素则用交联琼脂糖 4B 或 6B 进行分离纯化。如交联琼脂糖凝胶经酸处理，则可改进其亲和层析效果[7]。甲壳质已被用于对 N-乙酰氨基葡萄糖专一的凝集素的分离。许多凝集素的分离纯化可参看有关的综述和专著[5]。

用上述简单过程纯化得到的豌豆凝集素和其他一些凝集素已达到相当的纯度，可用于蛋白质一级结构的测定。

这个例子说明一些天然高聚物已被用作亲和层析的吸附剂。但这类例子除凝集素外还很少见。与此相似的是，一些实验室用交联的细胞作为亲和吸附剂，这是因为细胞表面也具有一些糖蛋白或受体，它们可作为配基，而细胞则被视为载体。然而更多的亲和层析所用的吸附剂，则是将某种特定的配基分子接到载体上。

二、 胰蛋白酶抑制剂的分离[6]

这是一个以生物大分子为配基进行亲和层析的例子。

1 固定化胰蛋白酶的制备

15ml 压积的交联琼脂糖 4B 用砂芯漏斗过滤，用水洗涤后，悬浮在 40ml 水中，加入溴化氰溶液(2g 溶于 3ml 水中)，立即用 5mol/L NaOH 节调 pH 至1 升，搅拌 10 分钟，同时用碱维持 pH 为 11。然后用砂芯漏斗过滤已活化的交联琼脂糖 4B，并迅速用 1 升冷水和 1 升 50mmol/L、pH9 的硼酸缓冲液先后洗涤。洗净的活化交联琼脂糖 4B 悬浮在 20ml 上述硼酸缓冲液中，并很快地加入 300mg 胰蛋白酶(用含 10mmol/L $CaCl_2$ 的上述缓冲液配制)。此混合物在 4℃ 温和搅拌 18 小时。接有胰蛋白酶的交联琼脂糖 4B 用 1 升含有 0.3mol/L NaCl、10mmol/L $CaCl_2$ 的上述缓冲液洗涤。然后装人 1.5×7.5cm 的柱中，用 0.1mol/L，pH4.0 的乙酸缓冲液平衡，备用。

2 胰蛋白酶抑制剂的分离

18mg 部分纯化的牛卵巢抑制剂溶于 2ml pH4.0 的乙酸缓冲液中，上已平衡的固定化胰蛋白酶柱，用平衡液充分洗涤柱，并未见任何抑制剂活性。改用含 0.5mol/L NaCl 和 10mmol/L $CaCl_2$ 的 0.1mol/L HCl (pH～1.2) 洗脱，可得一有抑制剂活性的蛋白质峰。活性成分对水透析，再经交联葡聚糖凝胶 G10 柱(0.9 × 61cm)脱盐，冷冻干燥。

3 说明

这例子介绍的是经典的交联琼脂糖活化的方法。近年来有所改进。一是将溴化氰溶解于乙腈中，通常是 1g 溴化氰溶于 2ml 乙腈中。这一改进的好处是溴化氰易于溶解，而乙腈又能和水混溶，提高了活化效率。另一改进是将交联琼脂糖 4B 悬浮在等体积的 2mol/L Na_2CO_3 (或 K_2CO_3) 中，在整个活化过程中 pH 基本上稳定在 10.5 左右，从而不必用 5mol/L NaOH 来调节并恒定悬浮液的 pH。

固定化胰蛋白酶不仅用于动物胰蛋白酶抑制剂的分离，也已用于植物来源的胰蛋白酶抑制剂的分离，例如天花粉胰蛋白酶抑制剂的分离[7]。

本节叙述的交联琼脂糖活化以及与大分子配基的偶联过程也可用于其他很多活性蛋白质的固定化。应该提及的是，免疫球蛋白的固定化又为许多抗原的分离纯化以及样品中少量杂质的除去提供了有效手段。

不论用固定化胰蛋白酶来分离抑制剂，还是用固定化抗体来纯化抗原都遇到同样的问题，即如何选择洗脱剂?因为这两个例子中，配基和被分离物质都是大分子，而且它们之间的相互作用又相当专一，很难找到合适的半抗原。因此，这类亲和层析中常用的洗脱方法都是较为剧烈，或是使用较为极端的 pH（例如 pH2—3 的盐酸，或 pH10—11 的有机胺），或是使用脲、盐酸胍、硫氰酸盐等。这样的洗脱条件都会影响到层析柱的流速以及缩短亲和吸附剂的使用寿命。

三、以 NAD 为辅基的脱氢酶的分离[8]

更多的亲和层析过程是以小分子作为配基。很多含有辅基的酶，辅基就可作为配基。这一节选用以 NAD 为辅基的脱氢酶的分离为例。

1 ε-氨基己酰-NAD^+-交联琼脂糖的制备

200ml 交联琼脂糖 4B（干重约 8g）用溴化氰活化，如上所述。20g ε-氨基己酸溶于 200ml0.1mol/L$NaHCO_3$ 中，加入活化的交联琼脂糖 4B 悬浮液中，用 4mol/LNaOH 调节 pH 至8.5。此混合物在室温中搅拌 15 小时，然后顺序用 0.1mol/L $NaHCO_3$，10mmol/L HCl，0.5mol/L NaCl 和水充分洗涤。过滤后得 80g（湿重）凝胶，再用大量的 80%(V/V) 的吡啶水溶液洗涤。接有 ε-氨基己酸的凝胶转移到三角烧瓶中，加入 NAD^+ 溶液(0.8g 溶于 24ml 水中)和二环己羰二亚胺(40g 溶于 96ml 吡啶中)。这一悬浮液在室温下温和搅拌 10 天。过滤，并先后用水、乙醇、40℃ 的正丁醇、乙醇、水和 80%(V/V) 的吡啶水溶液洗涤，以除去已形成的二环己脲。处理后的凝胶悬浮在第一次的过滤液中，另外加入10g 羰二亚胺，一周后再重复前述洗涤过程。此外，再用 1mmol/L HCl 洗 30 分钟，冰冷的 0.1mol/L $NaHCO_3$ 洗 5 分钟，最后用 0.5mol/L NaCl 和水充分洗涤。这样所得的制剂以湿的凝胶方法在4℃保存，在几个月内是稳定的。每克干重凝胶接有 50μmolNAD^+。

2 甘油醛-3-磷酸脱氢酶和乳酸脱氢酶的分离

ε-氨己酰-NAD^+-交联琼脂糖 4B柱(1.0 × 10.3cm)含有约17μmol 辅酶，用0.1mol/L、pH7.0 的磷酸缓冲液平衡。4.1 单位甘油醛-3-磷酸脱氢酶、37 单位乳酸脱氢酶和 0.9mg 牛血清白蛋白溶于 0.2ml 缓冲液的混合物上亲和层析柱。先用平衡缓冲液洗涤柱，可将牛血清白蛋白洗脱下来，不杂有任何酶活性。而甘油醛-3-磷酸脱氢酶和乳酸脱氢酶则分别为 0.15mmol/L NAD^+（氧化型辅酶)和 0.15mmol/L NADH（还原型辅酶)所洗涤。二者都不含有另一种酶的活性。

3 说明

很多酶、维生素和激素的结合蛋白以及激素受体蛋白的配基都是一些小分子化合物。它们大多可以直接挂到载体上。然而这样连接,小分子和载体过于靠近,致使一些生物大分子不易与配基结合。因此,在接上小分子配基前,常常先接上一些具有相当长度的间隔物(例如这一节中所用的 ε-氨基己酸),以此减小空间位阻,提高亲和层析效果。有一些双功能团试剂,诸如双环氧类化合物、戊二醛等,它们既可起到间隔物的,同时又作为偶联试剂。

四、 染料配基亲和层析纯化碱性磷酸单酯酶

长期来蓝色葡聚糖 2000 被用于测定凝胶过滤柱的外水体积。 后来发现在凝胶过滤时,有些酶竟和蓝色葡聚糖结合在一起。此后,新的染料配基亲和层析逐渐成为多种蛋白质分离纯化的有效的手段。今举一个用国产活性染料制备亲和吸附剂及其应用的实例[9]。

1 染料配基吸附剂的制备

这类亲和吸附剂的制备很方便。因为染料工业提供了很多活性染料，它们大多数是染料和三聚氯腈之类多功能团交联剂的反应产物。这些中间产物既有反应能力，在一定条件下仍能保存。目前最常用的染料配基是 Cibaron 蓝 F3GA (一种蓝色的蒽醌染料的衍生物)。国产的二种活性染料，艳蓝 K-GRS 和 Procion 红 HE-33 (这两者为上海染化八厂生产)都可代替 Cibaron 蓝 F3GA。

典型的制备过程如下：150g 湿重的交联琼脂糖 4B 悬浮在 500ml 水中。室温下,于15分钟内慢慢加入 4g 活性染料(悬浮在 100ml 水中)。此后加入 12g NaCl，搅拌 30 分钟,再加入 4g Na_2CO_3。45℃ 水浴中搅拌 48 小时。反应结束后，过滤凝胶，用大量水洗涤,至滤液无色为止。用交联葡聚糖凝胶 G-100 代替交联琼脂糖 4B 也可。

2 碱性磷酸单酯酶的纯化

由 1500g 新鲜小牛小肠上刮下约 500ml 肠粘膜，加入 1500ml 含 2mmol/L $MgCl_2$、2mmol/L$ZnCl_2$ 的 10mmol/L Tris-HCl 缓冲液,pH7.4 (以下简称缓冲液甲)。匀浆并搅拌 3 小时。然后加入 750ml 正丁醇至匀浆中，冷室搅拌过夜。 次日 4000×g 冷冻离心 1 小时,收集水相。界面处的沉淀用 500ml 缓冲液甲再抽提 30 分钟，离心，两次水相合并。调节水溶液 pH 至 5.0。4℃ 搅拌 2 小时后,4000×g 冷冻离心,取上清液,加入固体 Na_2CO_3，调 pH 至 7.0。硫酸铵分级,取 35—65% 饱和度这一级分。此级分先用 DEAE 纤维素柱层析纯化。接着再顺序用蓝色交联葡聚糖凝胶 G-100 和红色交联琼脂糖 4B 纯化碱性磷酸单酯酶。

染料配基柱(3.5 × 40cm)用缓冲液甲平衡后,将 DEAE 纤维素纯化的样品上柱，并用平衡液充分洗涤,至 $O.D_{280} < 0.1$。蓝色交联葡聚糖柱用含 0.1mol/L 磷酸盐的缓冲液甲洗涤,则得有酶活性的蛋白质峰。红色交联琼脂糖 4B 柱则用含 0.1mol/L 磷酸盐的缓冲液甲对缓冲液甲梯度洗脱,碱性磷酸单酯酶约在 0.05mol/L 磷酸盐时被洗脱。 经红色染

料配基柱纯化的样品在 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳上仅呈一蛋白质染色带。整个纯化过程,酶比活提高 1300 倍,回收率为 23%。用正丁醇处理时损失近一半。蓝色染料柱可纯化 4 倍,这一步的回收率为 62%,而经红色染料柱则可纯化 11 倍,而回收率高达 96%。

3 说明

原始的文献[10]在 80℃ 加热条件下进行偶联,这是因为活性染料上第三个可反应基团在此温度易于反应,但是交联琼脂糖 4B 在 80℃ 时全部分降解。故上述偶联改为 45℃ 较长时间的反应。

染料配基亲和层析最早被用于一些与核苷酸类有关的酶的分离。后来发现它们有很宽的亲和能力。很多血液中的蛋白质也可和染料配基结合。通过改变 pH 和离子强度等方法,有 27 种血浆蛋白可用这类层析分离纯化。特别要指出的是血清白蛋白和染料配基柱也有强烈的亲和力,约有 96% 的白蛋白可以被此柱吸附,而 90% 以上的免疫球蛋白却不被吸附。这就为一些血清蛋白质制剂中少量白蛋白的除去以及免疫球蛋白的纯化提供了一种简便有效的方法。

亲和层析已被广泛使用,有关的文献多得不胜枚举。然而基本大类则如表 1 所列举的,亲和层析所用的吸附剂的制备大体上也不外乎上述几种方式。但在实际使用亲和层析时则千变万化,应根据所需分离物质及其原始材料的性质,以及实验室所具备的试剂条件(包括载体、间隔物、偶联试剂以及配基等)设计简易又切实可行的方案。

尽管亲和层析是一种分离纯化蛋白质的有效方法,但在通常的分离纯化过程中还得辅以其他一些手段,借此得到预期的效果。例如用硫酸铵等试剂对原始材料进行分级仍不失为一种常用的有效方法。这是因为分级这一步骤不仅可以富集所需的物质,而且还可能除去一些小分子物质,其中有的则是能与所需分子相互作用的小分子配基或抑制剂,这就能提高亲和层析的效果。很多亲和层析所得的样品虽然都是具有所需生物活性的分子,但其中仍不乏活性相同,而化学结构略异的所谓"同功"蛋白质。要进一步分离这些"同功"蛋白质尚需借助离子交换层析、等电聚焦等等其他蛋白质分离纯化方法。

严格地说,亲和层析是专一的有生物学选择性的分离纯化方法,然而实际应用时也会发现一些非特异的吸附作用,有时会致使产物不纯。这种非特异的效应可以来自被分离物质与亲和吸附剂中非配基的相互作用。例如分离 β-半乳糖苷时,所用的配基是酶的抑制剂——对氨基苯基硫代半乳糖苷。可是高浓度的配基或酶的底物都不能作为洗脱剂,以至于只能通过改变 pH 的方法把酶洗脱下来。用苯胺代替上述抑制剂,即除去与酶作用的特异部分,同样可以达到分离纯化的目的。这足以说明一些非特异作用在此酶分离中的重要性。另一原因则是由于亲和吸附剂中的其他因素,诸如因使用间隔物而引进的疏水作用,因偶联而引进的电荷等。例如溴化氰活化交联琼脂糖时,很自然地引进了正电荷,致使亲和吸附剂带有一定程度的离子交换特性。为此,在使用亲和层析时,要尽可能地消除或减少各种非特异的效应,在讨论所得结果时也应慎重。

参 考 文 献

[1] Jackoby, W. B. & Wilchek, M. (eds.), Methods Enzymol., 34, (1974).
[2] Scouten, W. H., Affinity Chromatography-Bioselective Adsorption on Inert Matrices, 1981, John Wiley &

Sons, New York.
[3] Allen, R. H. & Majerus. P. W., *J. Biol. Chem.*, 247, 7709, (1972).
[4] Trowbridge, I. S., *J. Biol. Chem.*, 249, 6004, (1974).
[5] 孙册等,《凝集素》第9页，1986，科学出版社.
[6] Chauvert, J. & Acher, R., *FEBS Letters*, 23, 317, (1972).
[7] 王克夷等,生物化学与生物物理学报，15,623,(1983).
[8] Mosbach, K., Methods in Enzymol., 34, 229, (1974).
[9] 徐伟军等,生物化学与生物物理学报，18,410,(1986).
[10] Böhme, H. J. et al., *J. Chromatogr.*, 69, 209, (1972).
[11] Cuatrecasas, P., *J. Biol. Chem.*, 245, 3059, (1970).
[12] Hofstee, B. H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 50, 751, (1973).

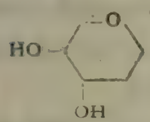
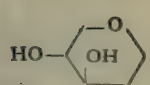
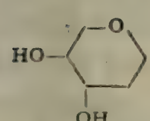
亲和层析用于糖蛋白的分离

王克夷

（中国科学院上海生物化学研究所）

自然界存在的蛋白质中有相当数量是糖蛋白。血浆中已发现的蛋白质有上百种，但

表1 常用凝集素的分类*

类型（按糖 C_3 和 C_4 构型）	来源	惯用名或缩写	糖结合专一性（血型专一性）	必需金属
1.  (L-Fuc)	欧洲荆豆	UEA-I	α-L-Fuc(抗 H)	
	百脉根	LTA	α-L-Fuc(抗 H)	
	鳗 血		α-L-Fuc(抗 H)	
	相思豆	Abrin	β-Gal	Ca,Mg
	蘑 菇		Gal-β-1-3-GalNAc	
	花 生	PNA	β-Gal(抗 T)	
	西非单叶豆	BS-I	α-Gal>α-GalNAc(抗 B)	
	欧洲卫矛	EEA	Gal(抗 B + H)	
	蓖 麻	RCA	β-Gal	
2. Gal 或 GalNAc	羊蹄甲	BPA	GalNAc-Gal	Ca,Mn
	双花扁豆	DBA	α-GalNac(抗 A)	
	大 豆	SBA	α-GalNAc>β-GalNAc(抗 A)	
	蜗 牛		α-GalNAc>α-GlcNAc(抗 A)	
	利马豆	LBA	α-GalNAc>α-Gal(抗 A)	
	槐	SJA	β-GalNAc>β-Gal(抗 A)	
	多花紫藤	WFA	GalNAc	
	巨刀豆	ConA	α-Man>α-Glc	Ca,Mn
	兵 豆	LcA		Ca,Mn
	豌 豆	PSA		Ca
	蚕 豆	Favin		
3. Glc 或 GlcNAc	西非单叶豆	BS-II	GlcNAc	Ca,Mg
	无柄锥花		GlcNAC-β-1-4-GlcNAc	
	高 陆	PWM		
	马铃薯	STA		
	欧洲荆豆	UEA-II		
	鲎		GlcNAc,NANA	
	小麦胚	WGA	GlcNAc-β-1-4-GlcNAc NANA	
4. 聚糖	曼陀罗	DSA	$(Gal\text{-}\beta\text{-}1\text{-}4\text{-}GlcNAc)_n$	
	半 夏		$(Man)_n$	
	菜 豆	PHA-L	见参考文献 [8]	

*（1）本表主要参考文献[4]，略加补充。（2）表中糖的缩写如下：Fuc，岩藻糖；Gal，半乳糖；GalNAc，N-乙酰氨基半乳糖；Glc，葡萄糖；GlcNAC，N-乙酰氨基葡萄糖；NANA，N-乙酰神经氨酸。凡未表明 L-型的糖，均为 D-型。

仅十余种是简单蛋白，其他均是糖蛋白。又如鸡蛋清中很多蛋白质也是我们经常研究的对象，这些蛋白质中糖蛋白的比例竟高达 90% 以上。

这些糖蛋白可以用前一节[1]介绍的亲和层析方法，根据它们的生物活性，进行分离纯化。而它们又含有特殊的组分——糖类，这为其分离纯化又提供了另一类型亲和层析方法。因为自然界中还广泛地存在着一大类可以和糖类专一结合的蛋白质，被称为凝集素[2,3]。原则上，将对某一种糖专一结合的凝集素作为配基接到载体上，制成固定化的凝集素后，就可用亲和层析分离纯化含有这类糖的糖蛋白。例如，伴刀豆球蛋白 A(缩写为 Con A)对甘露糖专一结合，目前，固定化的 Con A 已被广泛地用于很多糖蛋白的纯化或分离。

近年来由于亲和层析技术的进展，以及商业上提供的凝集素和固定化凝集素种类的增多，越来越多的糖蛋白可以用固定化凝集素进行分离纯化。再者，随着生物膜研究的深入以及细胞生物学和免疫学等学科的发展，人们对生物膜上糖蛋白更感兴趣，从而也纷纷借助固定化凝集素来分离纯化膜糖蛋白，乃至于在这基础上对细胞进行分级。

表 1 中列举了一些可用于糖蛋白研究的凝集素，并按它们的结合专一性分为四大类。

本文企图通过几个实例说明固定化凝集素在糖蛋白分离纯化中的应用。

一、 固定化麦胚凝集素纯化人血液结合素

血液结合素是血液中一种糖蛋白，它可和游离的血红素类结合，并将后者运送至肝脏。多年来虽然运用了一些方法也可得到几乎纯的血液结合素，但产率低、步骤多。1977 年Pharmacia 公司利用了固定化的 WGA 纯化了人血液结合素，具有较好的效果。典型的分离过程如下所述[5]。

100ml 新鲜人血清，加入数滴当量 NaOH，调至 pH8.0，加入 43ml (50V/V) 的聚乙二醇(平均分子量为 4000)，4℃ 搅拌 1 小时，3300×g 离心 15 分钟。上清液用当量 HCl 调至 pH4.6，加入 14g 固体聚乙二醇，搅拌，使最后聚乙二醇浓度为 25% (W/V)。3300×g 离心 15 分钟，沉淀溶于水，用当量 NaOH 调至 pH6.0，得 92ml 溶液。此 15—25% 聚乙二醇级分上 DEAE-交联琼脂糖-CL-6B 柱 (2.6 × 14.5cm)。 该柱用 50mmol/L，pH5.2 的乙酸缓冲液平衡，并展开。流速为 85ml/h。最先流出的蛋白峰含有血液结合素和转铁蛋白。 Pharmacia 公司的产品固定化的 WGA (每 ml 凝胶上接有 5mg 凝集素)装成 1.6×4.5cm 的层析柱，用 50mmol/L，pH7.0 的含 0.2mol/L NaCl 的磷酸缓冲液平衡，流速 22ml/h。离子交换柱分得的含血液结合素的级分上固定化 WGA 柱，用平衡液可洗去杂质转铁蛋白，血液结合素则被 100mg/ml 的 N-乙酰氨基葡萄糖 (用平衡液配制)所洗脱。

这方法共三个步骤。血液结合素的回收率为40%，但亲和层析这一步回收率达91%，样品的损失在离子交换层析过程中。用此方法得到的血液结合素进行聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳时，仅呈一条蛋白显色带，其他一些理化性质和生物学活性均和文献值一致。

二、 固定化兵豆凝集素分离猪淋巴细胞质膜糖蛋白[6]

1. 固定化兵豆凝集素的制备

每 ml 压积的交联琼脂糖 4B 用 20mg 溴化氰活化。然后悬浮在含有 0.1mol/L 甲基-α-葡萄糖苷的 0.1mol/L、pH8.4 的 $NaHCO_3$ 溶液中，加入 Lc A（以每毫升压积交联琼脂糖加入 1mg Lc A 计），2℃ 搅拌 18 小时。过滤后，交联琼脂糖再悬浮在 pH8.4 的5 mmol/L 乙醇胺溶液中，再搅拌 1 小时。继之，顺序用 0.1mol/L $NaHCO_3$、水、1%脱氧胆酸钠、2%甲基-α-甘露糖苷（用1%脱氧胆酸钠配制）以及1%脱氧胆酸钠洗涤，以充分洗去可能吸附的 Lc A。装柱备用。使用前，此柱再用 1% 脱氧胆酸钠洗涤一次。

2. 猪淋巴细胞质膜糖蛋白的亲和层析

猪淋巴细胞质膜制备后，用 1%脱氧胆酸钠增溶质膜蛋白[7]。2ml 增溶的膜蛋白（约 8 至 10mg）上 Lc A 亲和柱（1 × 8cm）。先用 1% 脱氧胆酸钠洗涤可得一个 280nm 有吸收的蛋白质峰，至光吸收降至基线，改用 2%（W/V）的甲基-α-甘露糖苷（1% 脱氧胆酸配制）洗脱，即得另一蛋白质峰。前后两蛋白质峰中，蛋白质和中性己糖的比例分别为87:13 和 17:83。这表明大部分糖蛋白在糖溶液洗脱部分。总的蛋白质回收率达 95%。后一蛋白质峰用 SDS-聚丙烯酰胺电泳揭示是多种糖蛋白的混合物，但不含有兵豆凝集素。

3. 说明

Con A 和 Lc A 具有相似的糖结合专一性，且两者都有促有丝分裂活性。Con A-交联琼脂糖也被用于淋巴细胞质膜糖蛋白的分离，但是总蛋白的回收只有80%，而糖蛋白的产率仅 5%。而固定化 Lc A 则可有较高的蛋白质回收率和糖蛋白产率。这是因为对甘露糖等的亲和力，Lc A 比 Con A 低 50 倍。

商业上已有固定化的 Con A 和 Lc A 产品。在实验室制备时，以及其后使用和保存期间，应注意两点：第一，为了防止凝集素在偶联过程中失活，通常在悬浮液中加入一定量的葡萄糖或甘露糖或它们的衍生物。在固定化其他凝集素时，则也加入它们专一的半抗原。在保存期间，加入一些专一结合的糖类，对其活性保存也有利。只是在使用前，必须洗净加入的糖类；第二，Con A 和 Lc A 的凝集活性都有赖于 Ca^{++} 和 Mn^{++} 的存在，因此在制备、使用和保存时，所用缓冲液的 pH 不适宜过高，同时加入一定量（例如 1mmol/L）的 Ca^{++} 和Mn^{++}。

固定化凝集素是分离纯化糖蛋白的一个有用工具，但正像其他方法一样，仅用固定化凝集素往往不能获得很纯的糖蛋白。这是因为许多糖蛋白的糖组分很相似，因此同一种固定化凝集素可以吸附多种糖蛋白。猪淋巴细胞质膜上的很多糖蛋白都被吸附在固定化 Lc A 上，而且又同时被2%的甲基-α-甘露糖所洗脱。又如 WGA 除了可以和血液结合素相互作用外，还可以和血清中很多糖蛋白结合，如铜蓝蛋白、α-酸性糖蛋白、α_2-巨球蛋白等。为此要得到较纯的糖蛋白，往往要同时结合使用其他一些蛋白质分离纯化方法，或者顺序地使用多种固定化凝集素，或用半抗原进行梯度洗脱。在分离血液结合素时，则先用聚乙二醇分级，除去 α_2-巨球蛋白、脂蛋白等，再经 DEAE 离子交换层析分离去α_1-抗胰蛋白酶、α_1-酸性糖蛋白等。主要杂质转铁蛋白最后才用 WGA 亲和层析除去。又如，固定化 Lc A 分得的猪淋巴细胞质膜糖蛋白仍是一个混合物，但它们中间有一些对菜豆凝集

素的亲和能力有所不同，故而可再次用固定化的菜豆凝集素进一步分离这一混合物。这种借助多种固定化凝集素柱分离糖肽，同时研究凝集素糖结合专一性的例子也有报道[8,9]。

参 考 文 献

[1] 王克夷，见本书第66页。
[2] Goldstein, I. J. & Hayes, C. E., Adv. Carbohyrd. Chem. Biochem., **35**, 128(1978).
[3] 孙册等，《凝集素》，1986 年，科学出版社.
[4] 辻勉和大沢利昭，蛋白质·核酸·酵素，**28**，118(1983).
[5] Vretblad, P. & Hjorth, R., *Biochem. J.*, **167**, 759, (1977).
[6] Hayman, M. J. & Crumpton, M. J., *Biochem. Biophys. Res Commu.*, **47**, 923(1972).
[7] Allan, D. & Crumpton, M. J., *Biochem. J.*, **123**, 967(1971).
[8] Cumming, R. D. & Kornfeld, S., *J. Biol. Chem.*, **257**, 11235(1982).
[9] Cumming, R. D. & Kornfeld, S., *J. Biol. Chem.*, **259**, 6253. (1984).

高效液相色谱在蛋白质和酶学中的应用

夏 其 昌
（中国科学院上海生物化学研究所）

高效液相色谱（HPLC）是一项分辨力很高的液相色谱技术[1-8]。它是由非常均一的微粒色谱载体和设计很精密的仪器组成。HPLC 和经典的液相色谱技术相比较，有下列几个优点：(1) 快速。常常以分钟为单位，整个分离过程仅几十分钟。(2) 分辨力高。(3) 分析灵敏度高，样品量只需 ng 或 pg 水平。(4) 分析样品若用紫外检出时可以回收，如果用作制备，制备量可达 1—10mg。(5) 同一根柱子可以分析几百个、甚至上千个样品，而用不到重新填装柱。

HPLC 的仪器设置类似于经典的液相色谱装置(图 1)。差别在于柱由不锈钢(标准柱内径 4.6mm，长 250mm)和微粒色谱载体 (5—10μ) 组成。由于载体粒度小，因此驱使液体流经柱需借高压泵来完成。与经典液相色谱相比，HPLC 的管道很细，检出器内流动池约10μl。近年来还引入 3μ 的载体，提高了分辨力。同时也出现内径仅 2mm 的微粒，不但节省了洗脱溶剂，也提高了分析的灵敏度，图 2 模式地说明了微粒载体的优点[2]。

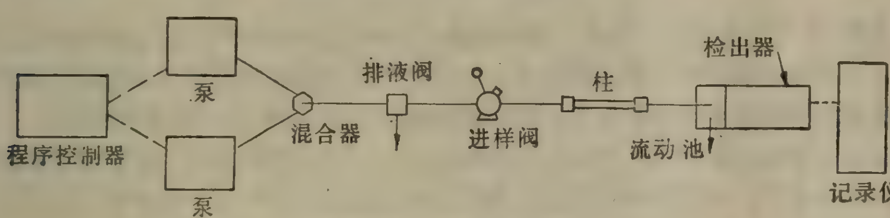


图 1 HPLC 装置示意图

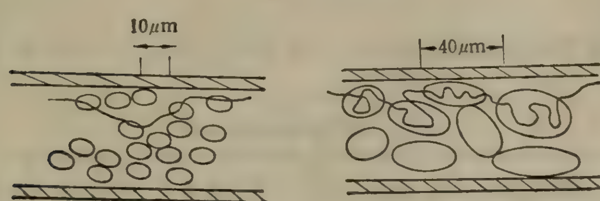


图 2 微粒载体在平衡和分析时间上都比经典的大粒载体有所改善。同时减小了扩散，峰形也更为尖锐

一、几类高效液相色谱和一些基本参数

1. 载体的结构

柱(其内含物为载体)通常称为 HPLC 的心脏，它们可以由多孔硅胶，多孔玻璃，亲水的有机凝胶或交联的聚苯乙烯等为基础形成。现有的 HPLC 主要包括体积排除色谱、离子交换色谱、反相色谱、疏水色谱和亲和色谱等类型。分离都是依赖于 (1) 固定相的结构

和组成，(2) 流动相和固定相之间的相互作用。

2. 吸附色谱和分配色谱

在载体硅胶的表面上有很多硅烷醇基团（约 8—9$\mu mol/m^2$），仅 5% 硅烷醇基团形成

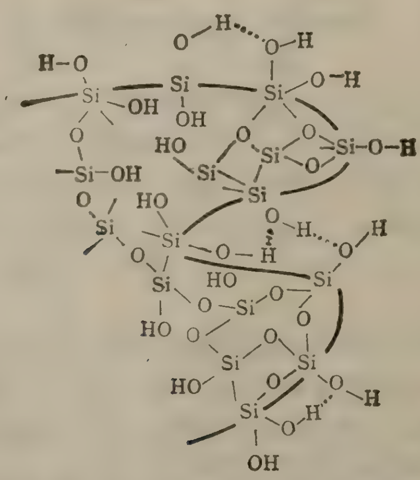


图 3　存在于硅胶颗粒表面上的硅烷醇基

分子内氢键，所以它的反应力很强。这些基团呈弱酸性（pKa5—7），能迅速和极性分子相互作用，这种性质被用于吸附色谱中——样品分子中的极性组分由于和载体硅烷醇基团相互作用最强而被保留在固定相上。加入极性组分（水、甲醇、乙腈）至流动相中，它们能作为极性分子覆盖在硅胶粒子表面上而被保留，这样不同的样品分子由于对吸附液层的不同分配而被分开。因此很难对吸附色谱和分配色谱的机理作一个截然的区别。

3. 反相色谱[2,7]

硅烷醇的羟基能和很多化学基团产生反应而共价联接上一个 -R 基团（称之为键合

表 1　常用的键合相介质

功能基团	极　性	应用范畴
$CH_3(CH_2)_{21}$—	极端非极性	脂类、碘代氨基酸
$CH_3(CH_2)_{17}$—	极端非极性	所有的生物样品
$CH_3(CH_2)_7$—	非极性	肽、蛋白质
CH_3CH_2—	中等极性	氨基酸
C_6H_5—	非极性	所有的生物样品
CH_3O—	中等极性	蛋白质、糖类
NC—	中等极性	蛋白质、糖类
CH_2OH—CH(OH)—	极性	分子筛
NH_2—	极性	糖类
R_3N^+—	阴离子交换剂	核苷酸
HO_3S—	阳离子交换剂	肽和蛋白质

相)，如果这个 -R 基团仍为极性基团，则仍属正常相色谱。如果 -R 基团为非极性基团，则就成了反相色谱载体，它与样品混合物中的非极性组分相互作用。表 1 列出某些常见的键合相色谱载体。

反相柱的制备是把不同链长的三氯硅烷(常见是 C_8 和 C_{18})通过硅氧烷桥联接到硅胶上去。应当指出，这种反应是不完全的，因此各厂产品之间有很大的差别，可以造成分离效果不同。由图 4 可见，仍残留有部分的 ≡Si-OH 基，这时可用 $(CH_3)_3$-Si-Cl 再次反应从而封闭所有的游离硅烷醇基团，称之为“戴帽”。这一处理对某些样品的分离很有影响(表 2)。

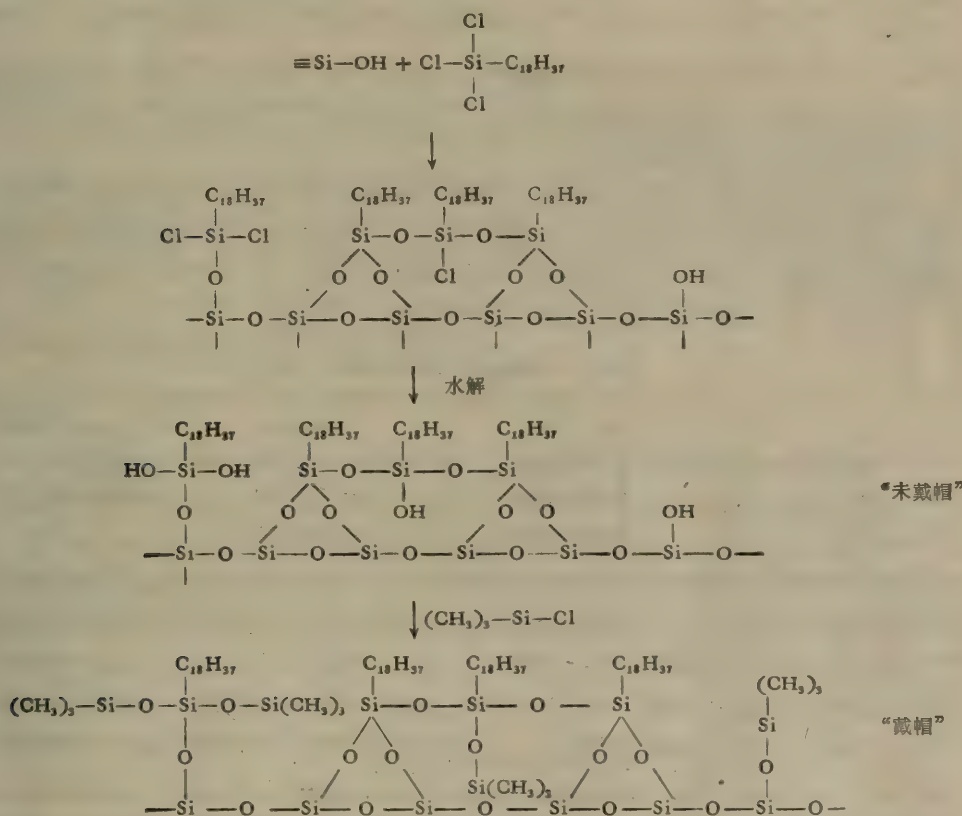


图 4　键合 C_{18} 反相至硅胶表面

表 2　“戴帽”和“未戴帽”的 C_{18} 柱对 PTH-氨基酸保留值的影响

氨基酸	侧链(R)	保留值*	
		戴帽前	戴帽后
缬氨酸	$-CH(CH_3)_2$	4.34	4.73
精氨酸	$-(CH_2)_3-NHC(=NH)NH_2$	4.33	1.67
组氨酸	$-CH_2-C=CH$ (咪唑环: NH, N, CH)	2.49	1.08

* 用 K′ 值测量。[采自 N. H. Cooke and K. Olsen, Amer. Lab., 45(1979)].

反相色谱可算是疏水色谱的一个分支，其作用都是发生在蛋白质非极性表面和固定相之间。和疏水色谱相比，反相色谱更为非极性，蛋白质甚至在低离子强度的水溶液缓冲液中也能结合到载体上去，通过增加有机溶剂的浓度而达到不同的解析。

4. 离子交换色谱[2,3,6]

在各种材料上共价联结上不同的离子基团，除强阴离子交换材料中之季胺($-^{+}NR_3$)、强阳离子交换材料中之磺酸型（$-SO_3^-$）外，还有弱离子交换材料 DEAE$\left(-C_2H_4{}^{+}N\begin{smallmatrix}C_2H_5\\C_2H_5\end{smallmatrix}\right)$ 和 CM(COO^-) 等。它们对各种蛋白质具有很好的交换能力，有的高达 10mg/分析柱。其效果比经典的离子交换柱层析好，而分析时间只需几十分钟。这种分离方法与样品中蛋白质离子性质有关，载体不但可以区别蛋白质中能和它反应的基团，也能识别电荷相同但电荷分布不同的蛋白质。

载体和蛋白质的结合强度是很多因素的协同结果（蛋白质上离子基团数，载体上的电荷密度，流动相的离子强度等），所以蛋白质从柱上的洗脱可以用增加盐浓度，也可用 pH 梯度变化，或者二者结合。硅胶的衍生物是最常用的载体（TSK-SW），亲水的有机多聚物（TSK-PW）也常用，且压力、流速和 pH 范围均广泛些。

表3 一些常用的 HPLC 离子交换柱

柱	原 材 料	功能基团	适用分离对象
TSK gel SCX	聚苯乙烯凝胶	$-SO_3^-H^+$	氨基酸、核苷酸、肽、多胺
TSK gel SAX	聚苯乙烯凝胶	$-N(CH_3)_3^+Cl^-$	羧酸
TSK gel CM-2SW	硅胶 TSKgel G2000SW	$-CH_2COO^-Na^+$	肽、生化代谢产物
TSK gel DEAE-2SW	硅胶 TSKgel G2000SW	$-C_2H_4N^+(C_2H_5)_2HCl^-$	核苷酸、有机酸
TSK gel CM-3SW	硅胶 TSKgel G3000SW	$-CH_2COO^-Na^+$	碱性蛋白质
TSK gel DEAE-3SW	硅胶 TSKgel G3000SW	$-C_2H_4N^+(C_2H_5)_2HCl^-$	酸性、中性蛋白质，核酸
TSK gel DEAE-5PW	亲水多副凝胶 TSKgel G5000PW	$-C_2H_4N^+(C_2H_5)_2HCl^-$	酸性、中性蛋白质，核酸

其他厂商的离子交换柱有 Pharmacia的 Mono Q（阴离子交换柱）和 Mono S（阳离子交换柱），Synchropak 的 AX-100，AX-300，AX-500，AX-1000 和 CM-300、QX-300 等。

5. 体积排除色谱[3,5]

又称为凝胶过滤色层，它在经典的液相色谱中长期以来就是一种重要的分离蛋白质和多肽的方法。载体本身有不同的孔径(100, 300, 500 Å 或更大)，可根据样品的分子大小和形状选择合适的载体而达到分离的目的。因为大分子被载体孔径排除而首先被洗脱出柱，较小的分子渗入载体孔径内而保留较长的时间。

载体材料可以是多孔硅胶（SW），也可以是有机凝胶（PW），前者应用 pH 范畴 2—7.5，后者可在 pH2—13 范畴内使用。一般用水溶性缓冲液作为流动相，pH 影响到

样品的离子化程度，从而影响到结合至带电的固定相上去。水溶性流动相又可以分为非变性和变性洗脱液二种：前者常含有 0.1—0.3mol/L NaCl 以减小次级离子的作用，后者常用尿素，胍或 SDS。

这种色谱法对泵的要求较高，需要很恒定的流速。例如 TSK 3000 SW 柱（7.5 × 600mm）的内体积约为 13ml，适用于测定分子量 40 0 00—400 000 的蛋白质，这意味着测量精度 ±1% 时，分子量测定值的误差可达 10%。进样的样品体积也要小，同时重演性也高，应在 2% 内。此外，流速对塔板数影响很大。

这一类柱有各种型号的 Protein I-60, I-125, I-250 和 LiChrospher。 Synchropak 和 Separon HEMA 等。

6. 疏水色谱

这是利用蛋白质表面上的疏水部位和疏水固定相之间的相互作用而达到分离效果的一种 HPLC，其中包含三种因素的相互作用：疏水载体，流动相的性质和样品分子。通常疏水色谱在高盐浓度下把蛋白质保留在固定相上，当降低盐浓度或降低溶剂极性或上升 pH 时，使不同的蛋白质在不同的时间从固定相上释放出来。例如 Spherogel-TSK-Phenyl 5 PW 柱。疏水色谱的另一个优点是省去了一般色谱上样前需要平衡脱盐的处理，而蛋白质的脱盐和平衡往往是很耗时间的。

7. 亲和色谱

亲和色谱法是在合适的载体上共价联接上一个配基，此配基能和样品混合物中某一组分形成专一的络合物而被吸附在柱上，在一定的条件下又能使该络合物解离释放出吸附的组分。这种利用生物分子之间亲和性质来达到从混合物中提纯样品的方法应用十分广泛。Beckman 公司有 Ultraffinity⁻TM-EP 柱供应，它是以一种刚性的硅胶粒子作为载体，粒度约 9μ，平均孔径 300 Å，具有活性的环氧化物基锚在硅胶微粒的表面，约 70μmol/g 载体，且“手臂”间距为 6 个碳原子。这种分析柱蛋白质容量可达 10mg，制备柱可达 100—200mg。例如在提纯谷胱甘肽-S-转移酶时，先把谷胱甘肽作为配基衍生到亲和柱；纯化 $tRNA^{tyr}$- 合成酶可用 $tRNA^{Tyr}$ 作为配基。因为环氧基对拥有 $—NH_2$，—SH，—OH 的配基能形成稳定的化学键（一般有 20% 可以衍生），所以使用 Ultraffinity™-EP 柱很方便，只须将含有配基的溶液低速下（0.1—0.2ml/min）循环流过色层柱就可以将柱衍生，而成为对某一样品专一的亲和柱。

也可以自己制备各种亲和色谱柱[8]。

8. 一些基本参数和色谱的关系

最重要的有三个参数：容量因素 K′，分离因素 α 和塔板数 N。

测量容量因子 K′，可以了解到样品在分离出现之前是否成功地保留在柱上。一般 K′ 值必需大于 2。

分离因素 α 是指色谱柱对两种不同的物质产生不同保留时间的能力。又称为选择性。

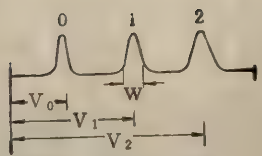


图 5　色层谱的参数

$$K_1 = \frac{V_1 - V_0}{V_0}$$

V_0 系统的绝对体积，不能保留的物质在此处出现。
V_1 和 V_2 分别代表样品 1 和样品 2 的保留体积。
上式也可以用保留时间 T_0、T_{R1} 和 T_{R2} 来表示。

$$\alpha = \frac{K_2'}{K_1'} = \frac{V_2 - V_0}{V_1 - V_0}$$

如果 $\alpha = 1$，则两种物质之间无分辨力可言。α 这一项受整个系统的化学性质所影响。如果有一个好的 α 值，其分离效果是相当好的。

塔板数N指在色谱展层过程中，样品分子保持不扩散，得到较窄峰形的能力。常用N来代表柱效。

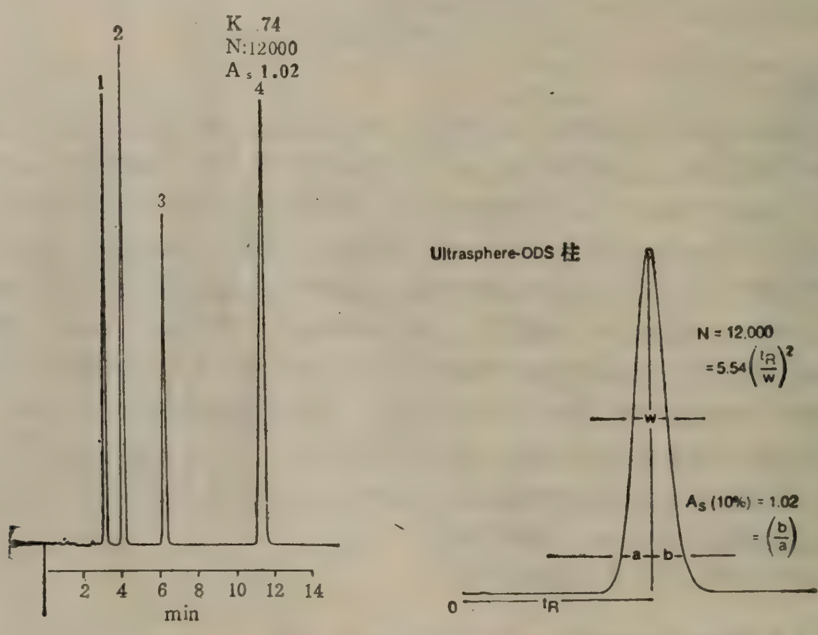


图 6　柱效测定和对称性测定

柱：Ultraphere-ODS 4.6×150mm　检出器：UV254nm　流动相：$CH_3OH:H_2O$ = 60:40　流速：1.0ml/min　试验混合物：1.乙酰苯　2.硝基苯　3.苯　4.甲苯　t_R：样品的保留时间　W：峰高 $\frac{1}{2}$ 时的峰宽度　As：峰的对称性，用峰高 10% 时的左右二侧峰半宽度来测量。

不同类型的柱，用不同的试验混合物来测量柱效，一般厂方在新柱商品内都提供这方面信息。塔板数受很多因素的影响，是对柱质量检查的一个重要指标。柱受到污染后，

N值会明显下降，当下降10—20%时，应采取措施以恢复柱效。

塔板数的大小和柱的长度有关，为了不同长度柱的比较方便起见，还引入了一个不依赖于柱长度的量——理论塔板高度H. H数值愈小，色谱柱的柱效愈高。

$$H=\frac{L}{N}$$

这里L是色谱柱的长度。

二、 实验中一些技术注意事项

1. 新柱的安置

新柱安置到HPLC系统中去，要确保最小的无效体积，即各部件之间的连接管道要短，用细内径（~0.3mm）的不锈钢管。用的螺帽和不锈钢套圈应匹配，连接处拧得松紧恰当而又不泄漏出液体。

新柱内都含有适当的有机溶剂，如果内含的有机溶剂和流动相的溶剂系统不能互溶，则需用一种居间的溶剂洗涤新柱。例如对含有己烷的柱，在引入甲醇、乙腈或水性溶剂前要用丙醇洗；反相柱常含有甲醇或乙腈，在使用缓冲液或盐溶液前要用水洗。

如果新柱是2mm内径的微柱，则还要考虑一些其他因素，譬如检出系统中是否要用更小的流动池；检出部件和纪录系统之间应有更快的响应时间。

2. 柱效的测定

新柱常有厂方提供的资料，说明柱的塔板数是多少，用的什么标准样品和分析条件。这些标准样品通常是小分子，在一般实验室容易得到的。建议重复一下这项实验，以便确定柱在运输过程中是否损坏。实验误差在5—10%范围内应该属于正常，因为涉及到溶剂的差别和柱以外的各种实验因素的影响。同时保存图谱和数据，如果日后怀疑柱受污染质量下降时，作对照检查用。

3. 流动相的制备[2,4]

流动相的选择是HPLC中的一个重要环节。常常因为溶剂选择不当而使样品清洗不充分而影响到色谱柱的寿命。溶剂也可能含有不溶性杂质而保留在柱上，渐渐改变了固定相的性质。不溶性物质也可能阻塞接头部分或管道，导致操作压力明显上升。为了避免这些问题，要求采用高纯度级的溶剂和试剂，且在使用前经微孔滤膜过滤。溶剂还需脱气以免空穴作用，因为泵都是止回阀门，形成空穴会影响正常的流速。此外溶解在溶剂中的氧还会引起低紫外区的吸收，造成噪音和梯度洗脱时的基线倾斜。溶剂若未经脱气处理，它在通过色谱柱后由于压力迅速下降，溶解在溶剂中的气体会释放出来，在检出器的流动池内形成小气泡而造成基线噪声。

（1）水 水是HPLC中最基本的溶剂，要得到不含有机杂质的纯水不是一件容易的事。水或缓冲液中的杂质往往积累在柱的顶端，其中大部分可在高梯度时洗脱出来；另外几乎所有的有机杂质在低紫外区可以检出。国际市场上专门有HPLC级的纯水供应，各个实验室也可以方便地制备各级纯水。例如把水通过离子交换柱、活性炭柱，最后

全玻璃蒸馏；也可把市售蒸馏水，加入适量高锰酸钾后重蒸，除去前馏分和后馏分。蒸水器和贮水器的连接部分都不能用乳胶管或橡皮管等联接，因为这会造成污染。水质的优劣可测电导和测绘紫外全波图谱来判别，有机溶剂质量的优劣也可以根据紫外光谱来判断（参见图7、8）。

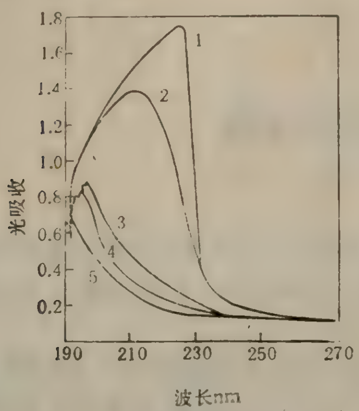


图7　不同纯度乙腈的吸收光谱

1.工业品， 2.无水 $AlCl_3$ 处理后，蒸馏产品， 3. $KMnO_4/LiCO_3$ 处理后重蒸， 4. $KHSO_4$ 处理后过滤， 5. CaH_2 处理后重蒸。

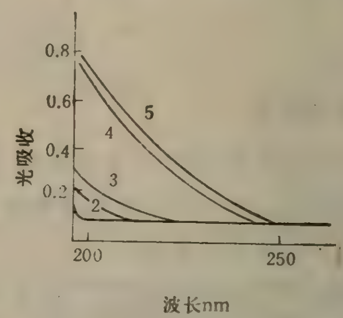


图8　一些有机溶剂的紫外光谱

1.水（HPLC），2.乙腈（HPLC级），3. Harding 氏法制备的乙腈，4.甲醇（HPLC级） 5.甲醇（A. R）。

（2）有机溶剂　最简单的方法是采购 HPLC 级的溶剂，因为较差的溶剂在梯度洗脱时会引起严重的基线倾斜，特别在低紫外检测时，甚至无法进行工作。图7示不同级别的乙腈的紫外光谱。溶剂应贮存在玻璃容器中，并通 N_2（避免 O_2）保存。稳定剂和抗氧化剂会引起麻烦，因为这些添加剂的分解，会产生有紫外吸收的物质。

在正常相色谱中，有机溶剂中若有水会降低硅胶柱的效率和影响分离的重复性，甚至重蒸或光谱级的溶剂也可能含有水而影响到灵敏的分离工作，这时要求进水无水处理。

表4　一些常用于肽和蛋白质 HPLC 分析的有机溶剂性质

溶　剂	紫外截止值*（nm）	沸点（℃）	粘　度（CP 25℃）	极性（E'）	介电常数(20℃)	溶剂强度
乙　腈	190	82	0.34	0.65	37.5	3.1
乙　醇	205	78	1.08	0.88	24.6	3.6
甲　醇	210	65	0.54	0.95	32.7	3.0
正丙醇	240	97	1.9	0.82	20.3	
异丙醇	210	82	1.9	0.82	20.3	4.2
吡　啶	305	115	0.88	0.71	12.4	
乙　酸		118	1.1	大	6.2	
甲　酸		101		大	58.5	
水		100	0.89	非常大	80	0.0

* 紫外截止值 UV cut-off（有些文献用 UV limit）是指在此波长处，溶剂的光吸收值为 1.0。这个指标可供我们选择低波长检测时的溶剂系统；也可用于判别一个溶剂质量的优劣。

（3）**离子对试剂**　蛋白质的溶解性质与带电状态密切相关，受溶液中带相反电荷的离子影响最大。这种离子称为配对离子或离子对。在大多数反相色谱中，亲水性太强以致保留时间短的化合物，在流动相中可以加入疏水的离子对，以增加保留时间，达到提高分辨力的目的。相反情况下则可在流动相中加亲水性的离子对以减少保留时间。离子对试剂的浓度一般在 5—10mmol/L，高浓度的离子对试剂易使色谱柱受到损伤，也可能在流动相中形成沉淀，阻塞管道和泵。

表 5　离子对试剂

阴离子	(RNH^+_3, R_2NH^+, R_3N^+)
	氯，溴，碘，甲酸，乙酸，三氟乙酸，柠檬酸盐，酒石酸，碳酸氢盐，
	过氯酸，苦味酸，磷酸盐，磺酸盐。
阳离子	($RCOO^-$，磷酸，$ROSO_3^-$)
	R_4N^+　$R = C_1 - C_7$　　R_3NH^+　$R = C_2, C_8, C_{18}$，吡啶
	$R_2NH_2^+$　$R = C_1, C_2$　　RNH_3^+　$R = C_1 - C_{12}$

（4）**流动相的稳定性**　许多溶剂与水混合后是比较不稳定的，例如乙腈在稀酸（0.1% 磷酸）中，会由

$$CH_3—C\equiv N + H^+ \rightarrow CH_3—{}^+C=N—H \rightarrow \text{多聚物}$$

异丙醇在酸存在下，对空气氧化更加敏感。由于这些原因，流动相切勿配制后贮存过久，尤其对于低紫外波长检测的工作，最好新配制。

4. 流动相的过滤和去泡

流动相在用于色谱之前，必需经过微孔滤膜过滤，对水相宜用 HA 型（纤维素型）0.45μm 滤膜，对有机相推荐用 FH 型（氟材料）0.5μm 滤膜。流动相的灭菌也是很重要的，因为许多盐（特别是磷酸盐）提供了微生物生长的适宜环境，这种污染可以影响到泵，并在梯度洗脱中出现伪峰。而微孔滤膜过滤是一种很方便的冷灭菌方法。

脱泡对于保证泵的有效工作和最适分离是重要的，脱泡的方法有：搅拌状况下真空抽气；0.5μm 滤膜重复过滤 2—3 次；超声和氦脱气法。抽真空的办法最简单，但要防止橡皮材料（压力管，塞子等）的污染而引起紫外吸收，有机溶剂的百分比也会因挥发而有些变化，可能会影响到色谱的重复性。氦脱气法要求氦气纯度高，否则会影响到含有异丙醇的流动相的稳定性。

5. 预柱

在进样器和分析柱之间安置一支预柱可以延长分析柱的寿命，一般增加 2—5 倍，因为流动相中的一些组分，特别是离子对试剂和去污剂，令不可逆地吸附到固定相上从而改变了固定相的性质。预柱中的载体应和分析柱一致。通常预柱为 4.6 × 50mm，粒度 30—50μm，预柱在进样 50—100 次后重新填装。

我们通常在进样器和分析柱之间增加一个过滤器（inline filter），可以过滤除去杂质保护色谱柱，过滤器内为 0.2—0.5μm 的微孔不锈钢片，易于更换或取下超声洗涤，对系统来讲也不增加无效体积。

6. 样品预处理

这是一个遇到问题最多的项目之一。由于样品来源不同，处理方法也极繁多。对于很多样品(蛋白质、肽等)因为已经初步提纯，所以在进样前只需除去微粒即可，但对其他的一些样品，例如血液或尿中的小分子组分的分析，可以用有机溶剂把小分子抽提出来分析，也可以用酸或有机溶剂处理把蛋白质除去，再进行分析。很多资料报道用 Sep-Pak C-18 小柱预处理样品，效果颇佳。

7. 洗脱方法

常液洗脱法最简单，即色谱过程中只用单一的平衡柱的缓冲液作为流动相，在体积排除色谱中即应用这种洗脱方法。阶梯洗脱法是采用几种不同浓度的盐或有机溶剂分几次洗脱，这可采用六相溶剂转辙阀来自动控制。梯度洗脱法为大家所熟悉，可采用程序控制器来达到任意梯度。

常液法允许大量样品的快速分析，因为至少可以节省去平衡色谱柱的时间，同时它有平稳的基线，尤其对于紫外检测来讲是一个很大的优点。但此法用于未知样品探测时常常不易得到准确的结果，譬如某样品在 5% 甲醇时不能洗脱出柱，但在 40% 甲醇时，样品却被沉淀在色谱柱上；这种方法的另一个弊病是一些杂质被保留在柱上并逐渐积累，总会影响到分离效果。常液洗脱法对于保留能力相当大的样品，洗脱时峰形不够好。

梯度洗脱法的优点是允许样品在一次色谱中以很广泛的极性来分离样品，因此对确定未知物的分离条件很有用。由于可任意设置梯度的形状，选择分离条件有很大的可塑性；对保留能力很大的样品也能给于很好的峰形；在高梯度时，实际上也起着清洗柱的作用。缺点是每次色谱后要重新平衡柱，平衡条件不同时对重复性有影响；梯度洗脱时(特别采用有机溶剂和低紫外检测)，会使基线倾斜，为降小基线倾斜，必需采用高纯度的试剂。

在采用离子对试剂时，为了最佳重复性，离子对的浓度在整个梯度中应保持一致。在洗脱过程中，温度、pH 和压力对色谱都有影响[2,7]。

8. 检出器

有关资料统计指出，HPLC 的检出器中，分光光度计占首位，约 70% (其中荧光计

表 6　不同样品的最小检出量(ng)

样　品	折光检测	紫外检测 (最适波长 nm)	荧光检测
氨基酸	—	1—200 (190—200)	5—15
肽	—	100—1000 (195—205)	0.3—15
蛋白质	—	80—200 (200—220)	10—15
糖	1.5×10^4	10^3—10^4 (192)	—
脂	5×10^4	10^3—10^4 (203—214)	—
核苷酸	—	1 (254)	0.2

占 20%)，第二位是示差折光，第三位是电化学检测器。

HPLC 中常用的检出方法灵敏度见表 6。

为了提高检测灵敏度，蛋白质也常用低紫外区，这对溶剂的纯度要求很高。荧光方法一般比紫外检出灵敏二个数量级，有的样品有内源荧光，有些样品本身没有荧光，这可以设法转变成有荧光的衍生物后再检测，例如用苯二醛 (OPA) 法检测氨基酸。

在肽和蛋白质的分离中，可从柱的洗脱液中借取样阀分出 1—10% 的量去和荧光试剂(荧光胺)反应而检测，其余绝大部分可用收集器收集(图 9)[1,9]。

近年来发展了快速扫描紫外检出器，采用几百个通道的二极管列阵，建立相应的光学系统和测量系统，实现了随峰扫描全波，这样可以同时得到有关组分的色谱图和光谱图。

折光检测是测量流过液体的折光变化，是种通用型的检测器，灵敏度比紫外检测低二到三个数量级。

电化学检测器的特点是选择性高、灵敏度也很好。

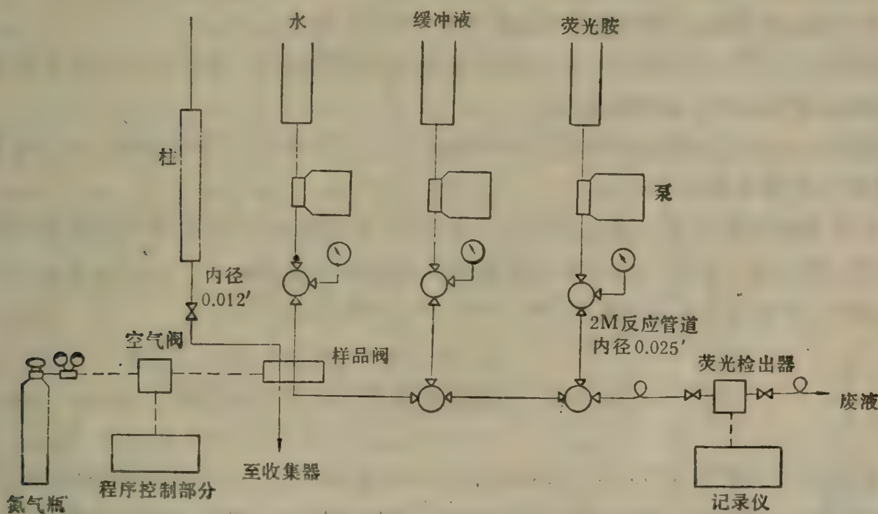


图 9 蛋白质和肽的荧光胺柱后分样系统装置图

9. 柱的平衡、清洗和贮存

在多肽和蛋白质的分离中，除凝胶过滤法用常液洗脱外，大多采用梯度洗脱法，确保每次分析前色层柱处于相同的状态是获得重复性的关键。 最好采用反梯度回到原始状态，再用起始的缓冲液平衡 5—10 柱体积。如果 A 液和 B 液是不同的 pH，则需平衡更多的时间。

柱在应用多次后，有些物质很强地吸附在柱上，引起压力上升和色谱行为的改变，这时需用多种溶剂洗涤以清除吸附在柱上的“杂质”。没有一种通用的溶剂能除去固定相上所有的杂质。 表 7 列举出一些常用有效的溶剂系统供参考。 有些高浓度的有机溶剂在蛋白质色谱中并不是最强的洗涤溶剂，而这些溶剂和缓冲液、有机酸或离子对试剂 50:50 时，却是较好的洗涤体系。例如对反相柱来讲，TFA 水溶液-丙醇是一个很有效的除污染溶剂。去垢剂 SDS 和 Triton 是很好的除去 HPLC 中蛋白质的系统，一般作为较

表7 清洗 HPLC 柱的溶剂

反相色谱和体积排除色谱		
	乙酸	1% 水溶液
	三氟乙酸	1% 水溶液
	0.1% 三氟乙酸/正丙醇	40:60
	TEAP*/正丙醇	40:60
	尿素或胍水溶液	5—8mol/L
	氯化钠、磷酸钠、硫酸钠水溶液	0.5—1.0mol/L
	DMSO-水	50:50
离子交换色谱		
	乙酸	1% 水溶液
	磷酸	1% 水溶液
	氯化钠、磷酸钠、硫酸钠水溶液	1—2mol/L

* 三乙胺-磷酸：用三乙胺调节 0.25N 磷酸至 pH2.5

后采用的方法，且用后立刻用超纯水充分洗涤，再用甲醇洗。

清除柱时也要注意前后采用的洗涤系统相互渗溶的问题。在使用粘度较大的溶剂洗柱时，应降低流速，防止太高的压力。

只有采取一系列洗涤系统不太见效的情况下，可考虑打开柱的顶端，除去污染的表面，再用相同的载体填柱的办法。

柱在不用时应充分用水洗去盐或缓冲液，然后用甲醇或乙腈(硅胶类反相柱)充满柱。柱端封闭口要拧紧，防止干涸可能引起载体几何形状的变化。

Regnier 详细介绍了凝胶柱 TSK 3000SW 的再生效果[3]。

三、HPLC 在蛋白质化学中的应用

蛋白质结构分析自 1953 年 Sanger 测定牛胰岛素顺序(51 个氨基酸残基)以来已有三十多年历史，近年来已能测定到β-半乳糖苷酶的全顺序(1021 个氨基酸残基)。以往一、二十年中，各类离子交换柱和凝胶过滤法是常规的提纯蛋白和分肽的方法，但色谱全过程需要很长的时间。小肽的分离过去常用纸电泳和纸层析法，但滤纸的预处理很麻烦，回收率也较低。HPLC 技术在 70 年代中期引入蛋白质化学分析领域中，逐渐取代了上述经典的色谱法，显示了巨大的生命力。这主要是在柱的载体化学上有了突破，目前经典的色谱法都可以在 HPLC 中找到相应的方法；同时在仪器上也有很大的发展，微电脑的普遍使用，已能控制梯度，柱的再生和自动进样、结果数据处理等等，达到了智能化。

1. 氨基酸分析

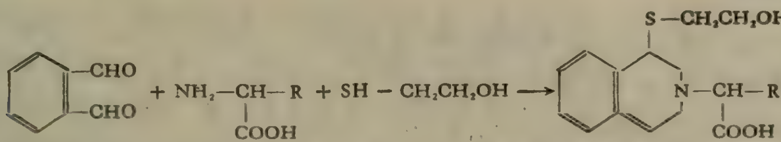
蛋白质化学中应用最广泛的是氨基酸分析，自从 Spackman、Stein 和 Moore 的氨基酸自动分析方法建立以来，又发展了一些更灵敏的荧光测定法，特别是柱前反应的邻苯二甲醛(OPA)法，因为仪器要求简单，为很多实验室所采用。

氨基酸分析可以分为柱后反应法和柱前衍生法两大类。前一种方法是将游离氨基酸经过色谱柱分离后，各种氨基酸再与显色剂(茚三酮、荧光胺、邻苯二甲醛)作用，仪器需用

专门的氨基酸分析仪或用 HPLC 加上柱后衍生装置(参见图 9)[1,9]。后一种方法是把氨基酸和荧光试剂先作用生成氨基酸的衍生物,然后再用柱把各种衍生物分离,直接检测衍生物的荧光,此法可检测 OPA—、PTC—、PTH—、Dansyl—、DABTH— 和 DABS —氨基酸等[11]。

2. OPA 柱前衍生法定量分析氨基酸[10,12,13]

(1) 作用原理 邻苯二甲醛(OPA)能在还原剂 —SH 存在下与一级胺产生具有很强荧光的异吲哚衍生物。



(2) 试剂配制与反应条件 5.0mg OPA 溶于 0.1ml 甲醇,加入 50μl 巯基乙醇,再用 0.2mol/L pH9.5 的硼酸缓冲液稀释至 1ml,每隔二天加入 5μl 巯基乙醇以维持离子强度。此试剂通氮气后贮存于暗处,能使用约 2 周。

10μl 标准氨基酸混合液(50—500pmol)或样品水解液,加入 10μl 0.4mol/L pH9.5 硼酸缓冲液,然后再加入 10μl OPA 试剂,室温下混合均匀,1 分钟后加入 20μl 0.1mol/L 的 KH_2PO_4 中止反应,并立刻取 20μl 进样至RP-C18 柱中进行分析。

(3) 结果和讨论 本实验室常规分析如图 10 所示[10]。

灵敏度 目前茚三酮的自动化分析仪分析氨基酸水平在 1—5nmol, 而 OPA 法可达 100pmol 或更少(荧光检测的 EX360nm, EM455 nm), 如果没有荧光检出器, 也可检测 340nm 的光吸收[14]。有一些实验室报道 OPA 荧光检测可达 50—100fmol[11,15] 这一方面与仪器有关, 但实际上这些实验室的常规分析仍在 100pmol 水平上。加入 SDS 或表面活性剂 Brig-35 到 OPA 中, 可以改善赖氨酸的稳定性和增强其荧光[12,14]。

重演性 为获得稳定的保留时间, 柱的平衡时间和条件要相同,这点是很重要的。OPA 方法的一个固有缺点是衍生物的荧光不稳定, 随时间变弱, 这可以加入内标 α-氨基丁酸 (α-ABA) 作为校正因子来克服[10]。

次级氨基酸 次级氨基酸不能和 OPA 反应,这可在反应前将它们转变成一级胺来补救[13]。半胱氨酸在 OPA 中灵敏度很低, 这可以用过甲酸氧化成半胱磺酸 (CA) 或用碘代乙酸还原成羧

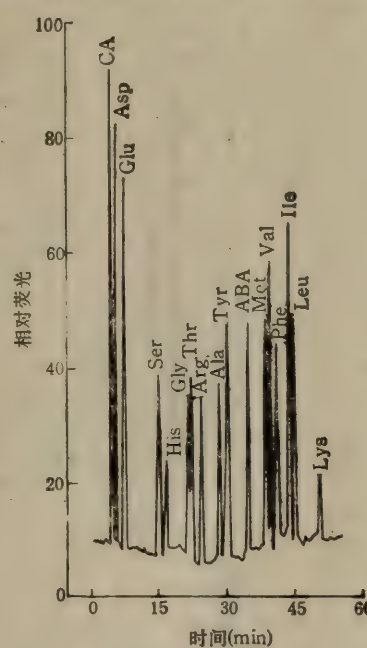


图 10 标准氨基酸图谱

柱: Altex RP-18 5μm(4.6×250mm)标准氨基酸: Pierce 产品,各种氨基酸均为40pmol ABA α-氨基丁酸 BDH 产品 40pmol 流动相A. THF: 乙醇: 50mmol/L醋酸缓冲液 pH5.9 = 3:12:85 B. 乙醇: 50mmol/L 醋酸缓冲液 pH5.9 = 65:35 流速: 0.9ml/min 线性梯度。HPLC 仪和荧光检测器均为本实验室自装。

甲基半胱氨酸(色层位置在谷氨酸后面)后再与 OPA 反应,从而提高了灵敏度。

流动相　　各种流动相系统很多,大多采用甲醇、乙腈。本实验室发展了无毒的乙醇系统,但由于粘度较大,所以系统的压力也偏高一些。

梯度　　不同型号的仪器在梯度上会有些差别，各实验室可在文献的基础上作些修改以适应自己仪器的需求。

生理体液和血清中的游离氨基酸分析：　样品预处理可用1体积样品和三体积乙腈(含有巯基乙醇)混合均匀后高速离心,取上清液进行氨基酸分析[15]。

3. PTH-氨基酸

Edman 在 1956 年引入异硫氰酸苯酯（C_6H_5NCS，简称 PITC）试剂用于蛋白质和肽的 N-端氨基酸分析。这个经典的方法发展至今有液相法，也有固相法;有手工顺序操作,也有自动化的顺序分析仪。PTH-氨基酸的鉴定有纸色谱、薄层色谱、高效液相色谱和把 PTH-氨基酸反水解成游离氨基酸再来鉴定。其中用 HPLC 最为快速和灵敏,并且能自动化。分析的柱可以是-CN 柱,也可用反相 C-18 柱，还有专门用于分析 PTH-氨基酸柱供应。分析的方法有常液法,也有用各种梯度法。操作可以在常温下进行,更多的报道是在恒温(45—55℃)条件下进行分析。方法繁多,直到现在每年还有很多改进的报道发表。

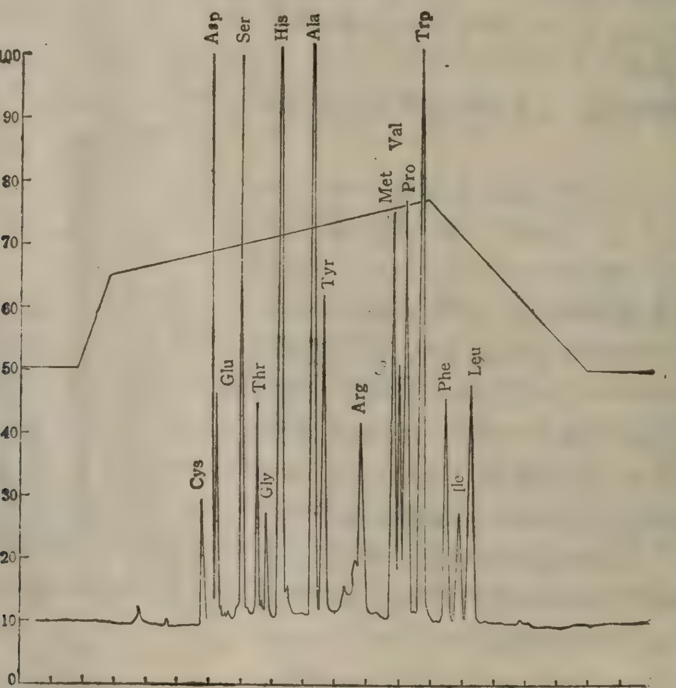


图 11　标准 PTH-氨基酸图谱

Beckman 344　PTH-AA：～50—100pmol　柱：Ultraphore PTH-AA 柱 5μ (4.6×250mm)。　柱温：水浴夹套恒温 50℃，　流动相：A. 15mmol/L 醋酸钠缓冲液 (pH4.5)：乙腈=90:10　B. 15mmol/L 醋酸钠缓冲液 (pH4.5)：乙腈=10:90　流速：1ml/min　检出器：UV254nm 量程 0.05AUFS，　梯度：0—1min　0—30% B　1—11min　30—55% B　11—16min　55—0% B。

我们采用 Beckman PTH-氨基酸专用柱，把常出现的17种 PTH-氨基酸在 20 分钟内分辨开，灵敏度为 50pmol 或更少(图 11)。如果峰形分辨不够理想时，可以改变 pH 或者变化缓冲液离子强度来调整各个 PTH-氨基酸的位置(保留时间)。

4. 肽和蛋白质的分离纯化

在肽的分离中，反相色谱是最有效的。肽先溶解在缓冲液或稀酸水溶液中上柱，最初用于分肽的溶剂系统是稀磷酸，但大肽在稀磷酸中的溶解度不好，且在制备工作时样品中引入了很多盐。甲酸和乙酸以及三氟乙酸在分肽中是很有效的系统，吡啶系统也极佳，它们都是挥发性的溶剂。流动相中有机溶剂用甲醇或乙腈，对大肽和疏水性强的肽用丙醇，有机溶剂浓度一般在 15—60% 范围内。由洗脱肽的能力来安排，其顺序大致为：

正丙醇 ≥ 异丙醇 > 四氢呋喃 = 二氧六环 ≥ 乙醇 = 乙腈 ≥ 甲醇

反相色谱中，孔径也是一个重要的因素，对分子量大的蛋白质来讲，300 Å 柱的回收比 100 Å 要高，而对小肽或分子量小的蛋白质而言，则孔径影响不是很显著。此外，流速、温度、pH 对色谱行为都有影响。

蛋白质和含有芳香族氨基酸的肽的检出可在 280nm 或 254nm。如果用 210—230nm 检出灵敏度可提高 5—10 倍，当然对溶剂的要求也要高得多。

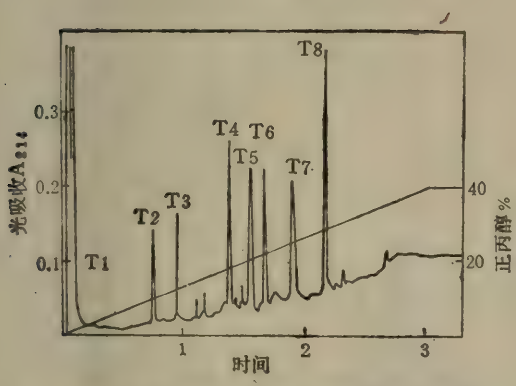


图 12 霍乱毒素活性亚基的胰蛋白酶酶解肽谱[16]

15nmol溴化氢裂解片段 (CnI) 用 TPCK-胰蛋白酶消化、然后用 RP-C18 柱 (4.6×250mm) 分离、流动相 A：0.1% TFA 水溶液 B：0.1% TFA-40% 正丙醇 流速：1ml/min。

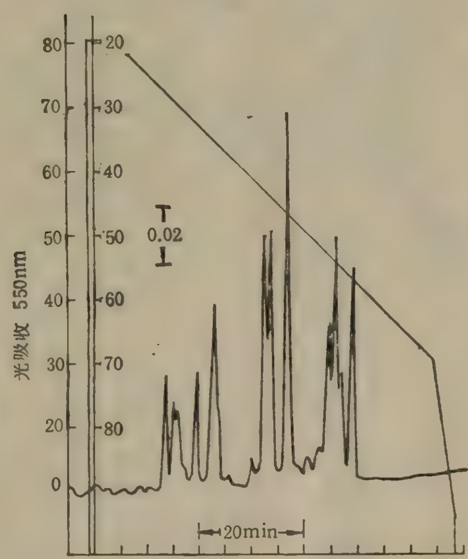


图 13 DABTC-肽谱

RP-18 柱 (4.6 × 250mm) 10μm 100Å 流动相(A) 0.1% TFA 流动相(B) 0.1% TFA, 60% 异丙醇

除用紫外检出外，也可用荧光方法，例如将肽和荧光胺或 DABITC 等试剂反应后生成有色的肽，可在荧光下或可见光下检出[1]。

合成多肽也能用反相色谱层法分离，反相色谱还成功地用在肽的异构体分辨上。

蛋白质的分离纯化，除用反相色谱外(图 15)，还广泛地用离子交换柱，疏水柱和高速

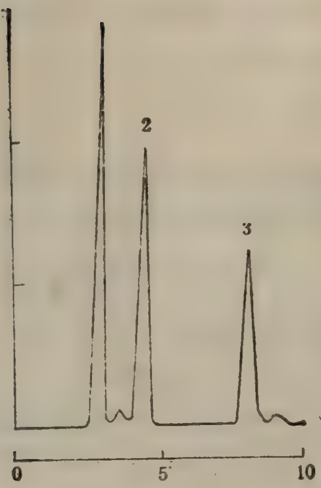


图 14　肽异构体的色谱分离
柱：RP-18，10μm，46×250mm
移动相：0.1mol/L 磷酸 pH2.1
流速：2ml/min
温度：25℃
1. {L-Ala-L-Ala-L-Ala / D-Ala-D-Ala-D-Ala}
2. L-Ala-L-Ala-D-Ala
3. L-Ala-D-Ala-L-Ala

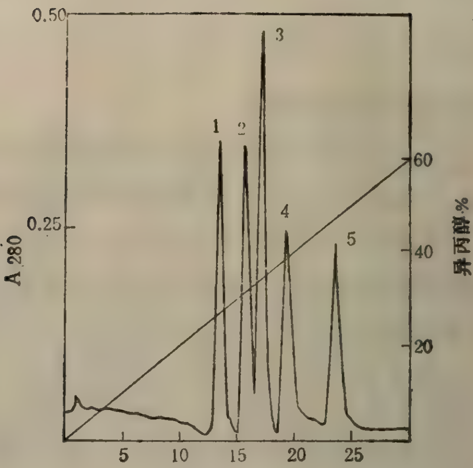


图 15　某些蛋白质的反相色谱
柱：Cg 0.41×5cm 300Å 5μm
梯度：0.1% TFA-异丙醇系统
流速：0.7ml/min
样品：1. 核糖核酸酶 A，2. 胰岛素，3. 细胞色素 C，4.牛血清白蛋白，5.卵白蛋白。

凝胶柱。

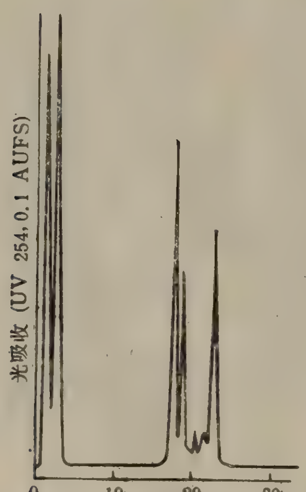


图 16　蛋白质混合物的阳离子 HPLC 色谱
柱：CM 4.1×50mm
流动相 A，0.01mol/L 磷酸缓冲液 pH6.0；
B，0.5mol/L 磷酸缓冲液 pH6.0。
梯度：30 分钟
流速：1ml/min。
样品：依洗脱顺序为：牛血清白蛋白；杆菌肽；胰凝乳蛋白酶原；细胞色素 C；溶菌酶。

5. 高效体积排除色谱法测定蛋白质分子量和鉴定蛋白质纯度

经典的生物高分子排除色谱(凝胶过滤)是利用软性的亲水凝胶，例如合成的聚丙烯

酰胺(Bio-Gel p)，多糖右旋糖苷（Sephadex）和琼脂糖（Sepharose 或 Bio-Gel A)。它们只能在低压下工作，因此平衡和分离是一个很长的过程，通常需几小时甚至几天。

采用控制孔径的刚性珠状硅胶，开拓了另一类的蛋白质体积排除色谱法，这一类材料有很高的极性和呈弱酸性的硅烷醇基团，且密度很高。硅烷醇基团作为阳离子交换部位而吸附变性的生物高分子，特别是等电点大于 7.5 的蛋白质，这一现象限制了其应用的范畴，近年来用硅胶为载体，涂合或化学键合上一层亲水相到硅胶表面上，从而发展成 HPLC 中一个重要的分支。

根据原材料，主要有 SW 和 PW 二种，但一般情况下，仍首先考虑采用 SW 型，适用 pH 范围为 pH2-7.5，主要规格有 TSK-2000SW，TSK-3000SW 和 TSK-4000SW（或者 Protein I-60 I-125 和 I-250)。TSK-2000SW 适用于小分子量蛋白质的分子量测定和分离鉴别，分子量约 5000—100000；TSK-4000SW 适用于分子量大的蛋白质，范围约 50000—1000000。

流动相一般为缓冲液(常用磷酸或醋酸缓冲液)，也可以含有一些有机溶剂(甲醇或乙

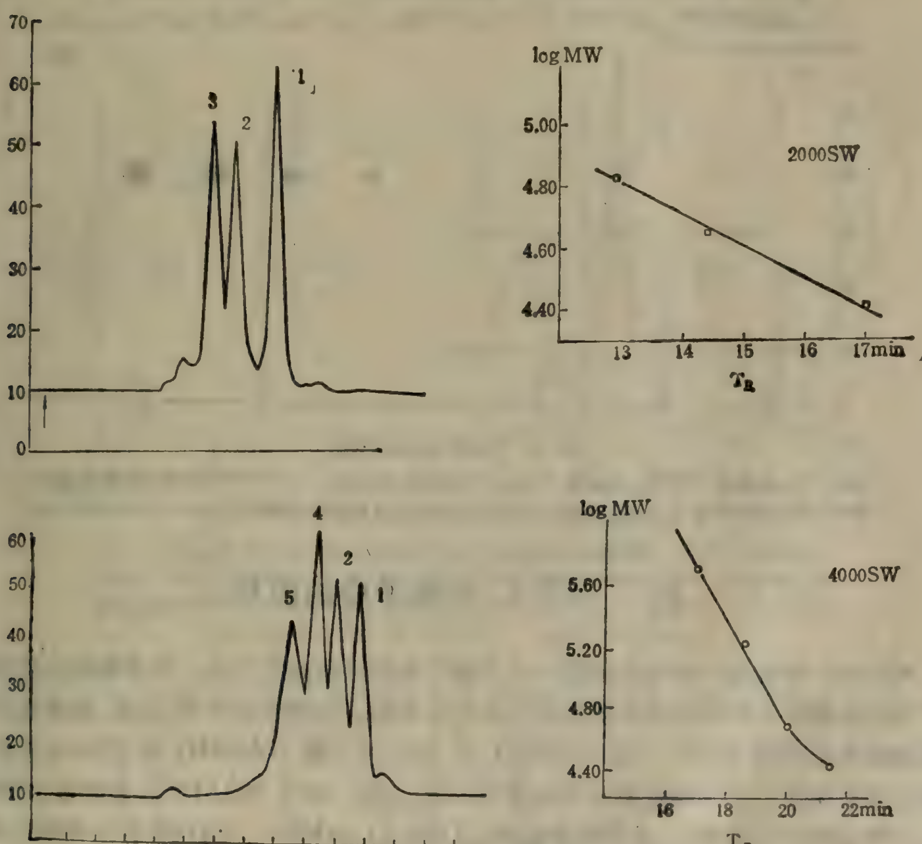


图 17 HPLC 凝胶过滤法测定蛋白质分子量

仪器：Beckman 344 421 程序控制器 112 型原 160 型检出器 280nm，0.5AUFS
柱：Beckman TSK-2000SW 和 TSK-4000SW 流动相：40mmol/L 磷酸缓冲液 pH6.8 150mmol/L NaCl 流速：0.5ml/min 纸速：0.5cm/min 样品：
1.胰凝乳蛋白酶原；2.卵白蛋白；3.牛血清白蛋白；4.蛇肌醛缩酶；5.铁蛋白。

腈)和变性剂(尿素,胍或 SDS). 流动相中常含有大于 0.1mol/L 的氯化钠以克服次级离子的作用,一般总的离子强度不超过 0.5mol/L.

凝胶柱的塔板数N和流速有很大关系，流速一般不超过 1ml/min，流速慢时塔板数N也大,分辨力好些。

对蛋白质回收或酶活性回收一般都很高，常用于纯化蛋白质和测定蛋白质的分子量或鉴定纯度，15—30 分钟即可完成,这个方法和 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳配合使用,可用在测定蛋白质或酶的解离聚合研究、亚基组成和蛋白质装配等研究工作中。

蛋白质的分子量测定：采用标准蛋白质为

1	胰凝乳蛋白酶原	MW 25 700	lgMW 4.41	本实验室制备
2	卵白蛋白	45 000	4.65	SEVER 产品
3	牛血清白蛋白	67 000	4.83	Fluka 产品
4	蛇肌醛缩酶	160 000	5.20	本实验室制备
5	铁蛋白	480 000	5.68	SEVER 产品

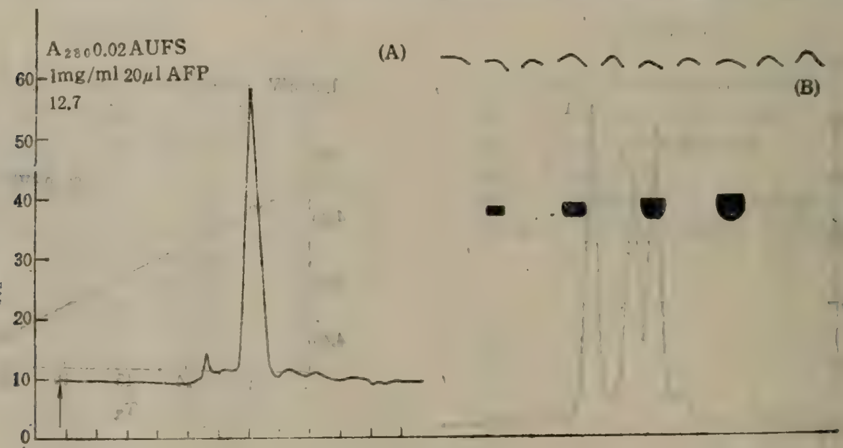


图 18 甲胎球蛋白纯度鉴定

(A) 甲胎球蛋白 (AFP)，进样量 20μg，20 分钟完成分析； (B) AFP 的聚丙烯酰胺凝胶电泳、样品量分别为 2、4、8、16μg，实验条件同图 17，纪录纸全量程为 0.02 (0.02AUFS)。

四、HPLC 在酶学中的应用

对任何一种酶进行研究都需要一个灵敏可靠的活性测定方法。很多酶的活性测定是借产物和底物有不同的光谱性质而采用分光光度法。这种方法简便、灵敏、重复性好。例如脱氢酶系都采用 NAD^+ (或 $NADP^+$) 和 NADH (或 NADPH) 在 340nm 处的差别而进行活性测定。另一些产物和底物是同源的 (例如 ATP 和 ADP)，光谱完全相同，但也可用酶偶联方法来测定，如丙酮酸激酶，可把它们与 NAD^+-NADH 体系偶联起来。

除分光光度法外，酶的活性测定还经常采用同位素法和在不同时间取样进行化学比色或色谱分析来计算酶的活性。

HPLC 方法也被发展用于测定酶的活性，迄今已有近百种酶建立了用 HPLC 测活的方法，而且还开展了酶动力学的研究[17]和低温 HPLC 的研究[18]。

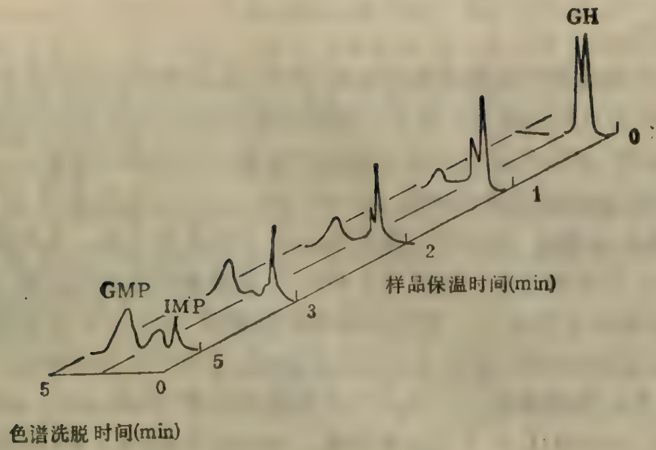


图 19 HGPRTase 测得系统的 HPLC 图谱

50μmol/L 鸟嘌呤 (G),50Pmol/L 次黄嘌呤 (H), 100μmol/L P-Rib-pp, 1mmol/L $MgCl_2$ 在 pH7.4 磷酸钾缓冲液中,不同时间(0—5min)取 10μl 进 HPLC 离子柱。0.5mol/L 磷酸铵 (pH4.0), 常液洗脱, 254nm 检测。

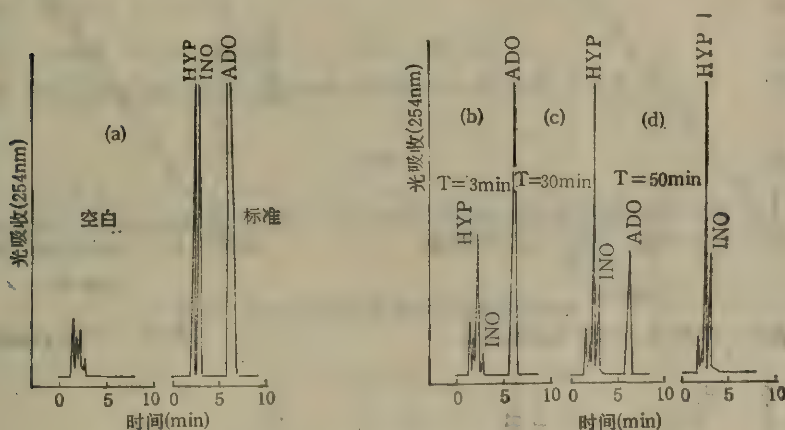


图 20 用 HPLC 法测定人红细胞中腺嘌呤脱氨酶活性

(a) 人红细胞溶胞产物的空白对照和三种标准样品: 次黄嘌呤 (HYP), 次黄苷 (肌苷 INO) 和腺嘌呤 (ADO);(b) (c) (d) 不同反应时间 (3、30、50 分钟)。可见到底物腺嘌呤的下降和产物的形成柱: Bondapak/C18; 洗脱液: 0.01mol/L KH_2PO_4/CH_3OH, 86:14 (V/V); 流速 2ml/min。

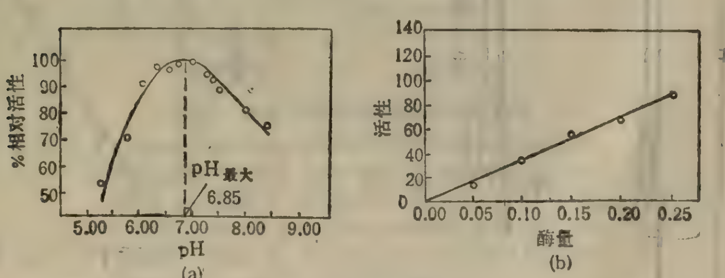


图 21 (a) pH 对腺嘌呤脱氨酶测定的影响;
(b) 不同红细胞体积(酶量)和酶测定的关系。

1. 酶活性测定

用 HPLC 法测定腺嘌呤脱氨酶的活性[19]通过鉴测腺嘌呤浓度的变化来进行。与其他方法相比较，此法可把内源酶引起的干扰降到最小，同时可以监测几种竞争酶反应的产物，图 19—21 是用 HPLC 法测定人红细胞中腺嘌呤脱氨酶的结果。

经典的测定谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-Px）活性方法是基于谷胱甘肽还原酶-NADPH 偶联系统，测定 NADPH 在 340nm 处光吸收的下降。本实验室建立了一种新的测定 GSH-Px 活性的方法，系用 RP-HPLC 直接测定生成的产物 GSSG[22]。这种方法微量，要求的辅助试剂也少。特别用酶偶联法测定 GSH-Px 活性时不能观察到直接产物对酶的激活或抑制作用，新的方法则无此弊病，可用于动力学研究。

(1) GSH-Px 活性测定　50μl 反应系统中含有 50mmol/L，pH7.2 磷酸缓冲液，1mmol/L GSH，1mmol/L t-丁基过氧化氢，1mmol/L NaN_3，0.4mmol/L EDTA 和适

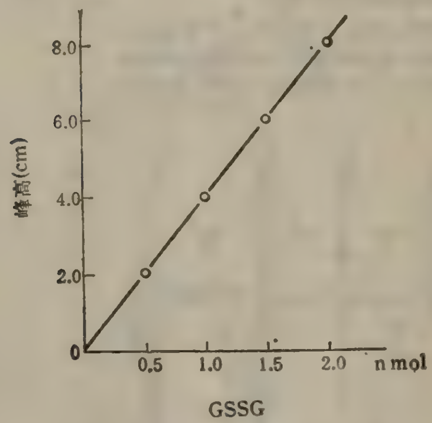


图 22　GSH 和 GSSG 的分离图谱

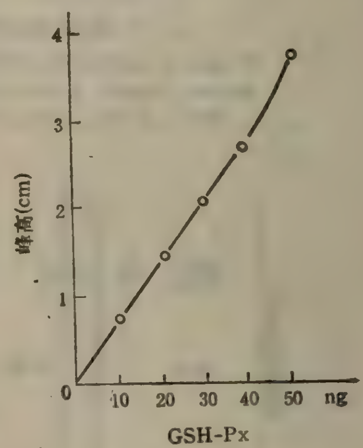


图 23　GSSG 的标准线

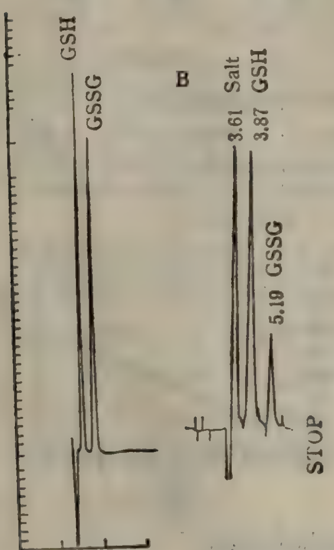


图 24　GSH-Px 反应的时测线

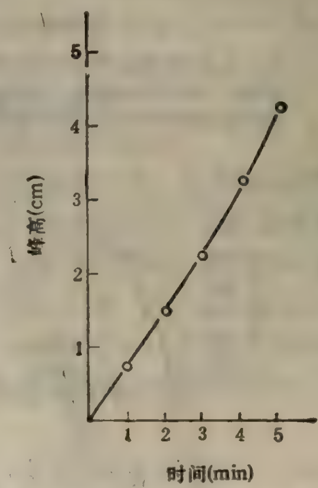


图 25　酶活性示酶量的关系

量 GSH-Px（20—30ng）。以加入 t-丁基过氧化氢开始反应，25℃ 反应 3 分钟后加入等体积 0.5% TFA 停止反应。取 20μl 上样于 RP-C18 柱，通过对 GSSG 的生成定量分析而计算酶活性。酶单位定义为 25℃ 下，每分钟氧化 1pmol 的 GSH 为一个酶单位，它相当于每分钟生成 0.5μ mol 的 GSSG。

（2）RP-HPLC 分析　Beckman 344 HPLC；Altex 反相柱 C18（4.6 × 250mm）；检出器：UV 214nm 0.1AUFS；流动相为 0.1% TFA-10% 甲醇水溶液：流速 1ml/min。

（3）结果　图 22—24 分别示底物和产物的分离，产物的标准线，酶活性和时间的关系以及酶活性和酶量的关系。

酶活性计算：

$$\text{比活} = \frac{(H - H_0)/3}{F/2} \times 5 \times \frac{10^6}{P}$$

$$\doteq \frac{\Delta H}{P} \times 833$$

式中 H　实验中测得的产物 GSSG 高度（cm）

H_0　空白对照中的 GSSG 高度（cm）

ΔH　峰净高 ＝（$H-H_0$）

F　1μmol GSSG 的峰高（～4.0×10^3cm）

P　50μl 酶活性测定系统中的 GSH-Px 蛋白量（ng）。

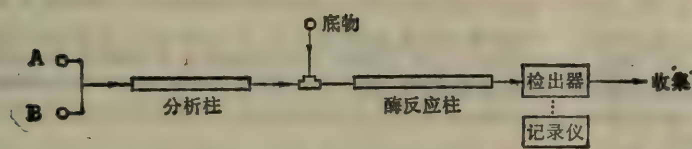


图 26　酶的分离和活性连续监测装置示意图

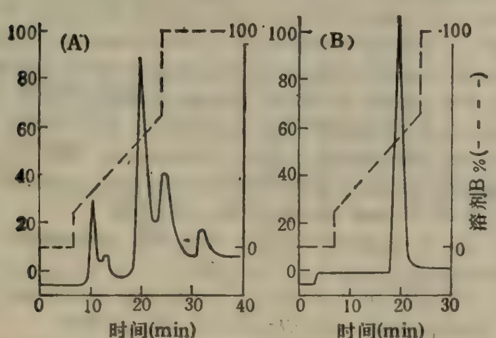


图 27　商品牛肠碱性磷酸酶的分级图谱

（A）8mg/ml 样品。分析柱 DEAE-Glycophse/CPG（37—74μm，250Å），25℃ 梯度为 0.05 mol/L Tris pH8.0，最后梯度为 0.05mol/L Tris pH8.0—0.3mol/L NaCl，A280 监测；（B）0.4mg/ml 样品，加上活性量测装置，酶反应柱 Glycophase G/非多孔性硅酸钠（40μm）底物 8mmol/L 对硝基酚磷酸于 0.05mol/L Tris pH8.0中，分析柱 1.3ml/min，底物泵 0.35ml/min 压力 300psi A_{410} 监测。其他条件同（A）。

如果实验室中有积分仪，则计算中可用相对积分面积取代记录仪中的峰高度。

2. 酶纯化过程中的酶活性连续监测[20]

酶的 HPLC 分离纯化过程和蛋白质提纯相同，但可以在分离提纯的同时监测酶的活性。

以商品牛肠碱性磷酸酯酶为例，用上述装置得到结果如图 27 所示。

用此法测定酶活性呈线性关系，同时也检查了样品在分析柱后和酶反应柱后的扩散情况和滞后现象。这一方法也用于肌酐激酶和乳酸脱氢酶同工酶的分离鉴定。

近年来有关酶活性测定的报道急剧增加，例如有关氨基酸合成酶系，均可在停止反应后用 OPA 法测定生成的氨基酸量来计算酶活性[21]。

参考文献

[1] Hughes, G. J. and Wilson, K. J., High-performance liquid chromatography: Applications in protein structure determination, Methods of Biochem. Analysis, **29**, 59(1983).

[2] Hancock, W. S. and Sparrow, J. T., HPLC analysis of biological compounds, Chromatographic Science Series, 26, 1(1984).

[3] Regnier, F. E., High performance liquid chromatography of proteins, Methods in Enzymology, **91**, 137(1983).

[4] Wehr, C. T., High performance liquid chromatography: Care of columns, Methods in Enzymology, **104**, 133 (1984).

[5] Unger, K., High performance size exclusion chromatography, Methods in Enzymology, **104**, 154(1984).

[6] Regnier, F., High performance ion exchange chromatography, Methods in Enzymology, **104**, 170(1984).

[7] Hearn, M. T. W., Reversed-phase high performance liquid chromatography, Methods in Enzymology, **104**, 190 (1984).

[8] Larsson, P. O., High performance liquid affinity chromatography, Methods in Enzymology, **104**, 212(1984).

[9] 夏其昌等，荧光胺法检测反相高效液相色谱肽谱的一种溶剂改良系统，生物化学与生物物理学报，**20**，424(1988)。

[10] 夏其昌等，应用乙醇系统的高效液相色层可在 10 微微摩尔水平定量分析氨基酸，生物化学与生物物理学报，**17**，747(1985)。

[11] Chang, J. Y. et al., Amino acid analysis in the picomole range by precolumn derivatization and high performance liquid chromatography, Methods in Enzymilogy, **91**, 41(1983).

[12] Jones, B. N. et al., Amino acid analysis and enzymatic sequence determination of peptides by an improved O-phthaldialdehyde precolumn labeling procedure, *J. Liquid Chromatogr.*, **4**, 565(1981).

[13] Bohlen, P., Analysis for imino acid with O-phthaldehyde, Methods in Enzymology, **91**, 17(1983).

[14] Chan, M. M. S., Amino acid analysis by HPLC, Beckman Bulletin, 5925.

[15] Jones, B. N. and Gilligan, J. P., O-phthaldialdehyde precolumn derivatization and reversed-phase HPLC of polypeptide hydrohysates and physiological fluids, *J. Chromatogr.*, **266**, 471(1983).

[16] Xia, Q. C. et al., The primary structure of the COOH-terminal half of cholera toxin subunit A_1 containing the ADP-ribosylation site, *Arch. Biochem. Biophys.*, **234**, 363(1984).

[17] Sloan, D. L., Kinetic analysis of enzymatic reactions using high performance liquid chromatography, *Adv. Chromatogr.*, **23**, 97(1984).

[18] Henderson, D. E. and O'Connor, D. J., Low-temparature high performance liquid chromatography for separation of thermally labile species, *Adv. Chromatogr.*, **23**, 65(1984).

[19] Hartwick, R. A. et al., An optimized assay for adenosine deaminase using reverse phase high pressure chromatography, *J. Chromatogr. Sci.*, **16**, 427(1978).

[20] Chang, S. H. et al., High performance liquid chromatography of proteins, *J. Chromatigr.*, **125**, 103(1976).

[21] Unnithan, S. et al., A high performance liquid chromatography assay for asparagine synthetase, *Anal. Biochem.*, **136**, 195(1984).

[22] 夏其昌等，用反相高效液相色谱法直接微量测定谷胱甘肽过氧化物酶活性，生物化学与生物物理学报，**20**，379 (1988)。

Edman 降解法测定蛋白质序列

林 南 琴

（中国科学院上海生物化学研究所）

50 年代初，Edman 采用异硫氰酸苯酯(Phenylisothio Cyanate，简称 PITC，Edman 试剂)首先建立了测定蛋白质的氨基酸序列的方法。1968 年 Edman 终于研制成功自动顺序仪（Sequencer)。近年来，又有高度自动化、微量化和精确灵敏的气液顺序仪问世。在各种测定蛋白质氨基酸序列方法中，Edman 降解法仍是最为准确、可靠的方法。

1. Edman 降解法的基本原理

Edman 试剂的化学反应，从蛋白质的多肽链的 N-端进行降解，一次只去掉一个氨基酸残基，经过反复循环反应，能依次得到一系列氨基酸的衍生物（PTH-氨基酸），分析鉴定 PTH 氨基酸就得到从 N-端开始的肽的氨基酸序列。其主要反应分为以下三步[1]:

(1) 偶合

蛋白质的多肽链 N-端氨基酸的氨基与 PITC 在无氧条件下，在 pH8—9 的缓冲液中，进行偶合，生成苯基硫代氨甲酰基肽的衍生物（Phenylthiocarbamyl derivative)。

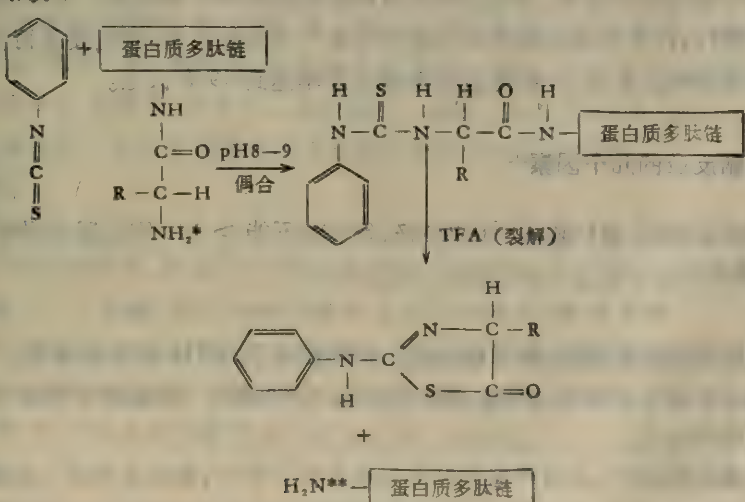
(2) 裂解

苯基硫代氨甲酰基肽衍生物与无水三氟醋酸反应，释放出 N-端的氨基酸产生苯胺噻唑啉酮（Anilinothiazolinone 简称 ATZ）衍生物和减少一个残基的多肽链。

(3) 转位

生成的 ATZ 衍生物极不稳定，必须迅速转化成苯基乙内酰硫脲-氨基酸（Phenyl thiohydantion 简称 PTH）后，进行鉴定。

总反应式为：



* 为从 N-端开始的蛋白质多肽链的第一个氨基酸的氨基。

** 为从 N-端开始的第二个氨基酸的氨基，每次反应减去一个氨基酸依次可以进行多次循环反应。

2. Edman 降解反应对样品要求

(1) 首先必须将蛋白质进行解聚成一条多肽长链分子。如果测定的蛋白质分子中含二硫键，必须将二硫键用氧化或还原的方法拆开，得到的含半胱氨酸的肽链必须保护，避免二硫键重新组合。含亚基的蛋白质分子，需将亚基拆开、纯化、分别测定。

(2) 蛋白质多肽链的 N-端必须是游离基团。有些蛋白质 N-端被乙酰基($CH_3CO—$)封闭，如乙酰细胞色素 C，乙酰烟草花叶病毒等。有的蛋白质的 N-端为环谷氨酸(pyroglutamic acid)、如兔 IgG 的重链、许多活性多肽等，都不能直接用 Edman 法降解。唯 N-端是乙酰-丝氨酸时，有个别报道可与 Edman 试剂反应[2]。

3. Edman 反应要求反应率尽可能接近完全

这样，从而能使蛋白质多肽链降解得到更多步的氨基酸序列：如表 1 所示。

表 1　Edman 降解反应率与剩余的 N-端量

反应率% / 剩余末端% / 连续降解步数	99	95	90
10	90	60	35
50	60	8	0.5
100	36	0.6	0.003

如果每步反应率为 90%，到第 10 步循环反应后，其剩余 NH_2 末端为$(0.9)^{10}=0.35$。因为产率低于 30%，得到的 PTH 氨基酸衍生物已无法检测了，所以序列测定只能到 10 步左右。为了保证高反应率，首先要求是高纯度的试剂与严格的操作条件；如反应在充氮无氧条件下进行；以及反应过程中尽量避免可能产生的副反应，同时要求待测定的蛋白质具有较高的纯度等。这样，一般可以使每步反应率达到 99% 以上。

4. 可能产生副反应的几个因素[1]

(1) 偶合反应的 pH 必须严格控制在 8—9，不能 > 10，因过碱会导致 PITC 与一级胺、二级胺反应。

$$NH_2 + Ph-N{=}C{=}S \rightarrow Ph—NH—CS—NH_2$$

当这些副反应的产物生成后，就很难除去。从而影响了 PTH-氨基酸鉴定。

(2) 偶合反应也不能 < pH8。测定的样品不可偏酸。因偏酸会使缓冲液 pH < 8，导致偶合反应不完全。

(3) 在偶合反应中，必须严格控制在无氧条件下进行，氧化会导致二硫磺酸副产物的产生。

(4) 偶合时，必须用高纯的缓冲液，杂质中往往含醛，会造成氨基被反应，以及形成

Schiff 碱使蛋白质多肽链产生不纯的联结肽，而造成肽链氨基酸序列测定中断。

(5) 在反应过程中，必须控制反应的时间及温度。延长反应时间及提高反应温度，都会导致副反应增加而影响鉴定。

(6) 蛋白质肽链中色氨酸残基很不稳定，在反应中易被氧化而使产物终止。因此，必须严格控制无氧的反应条件，否则色氨酸将会测不出。

(7) PTC-Gly-His、PTC-Pro-His 按常规的偶合和裂解反应，不能完全。必须通过反复循环测定，改变反应条件，如延长反应时间等。若反应不完全会影响下步循环中产生以上的联结肽，而影响肽链氨基酸序列测定的继续。

5. 试剂的纯化

Edman 反应中，在需用的高纯试剂中，除 PITC、TFA 在重蒸时需特殊处理外，其他试剂均为国产 A、R 级，只需用玻璃磨口蒸馏器，重蒸两次。

(1) 重蒸 PITC

用水泵减压，在通氮气下，减压蒸馏，达到恒定沸点时，收集蒸馏液。重蒸数次，直到蒸馏液呈无色透明溶液。小量分装于安瓿瓶中，封口、低温保存。

(2) 重蒸 TFA

国产 TFA 加入相当于 1% 的固体无水硫酸钙，脱水，室温放置两天，常压重蒸一次；重蒸后的溶液加入相当于 0.2% 固体甘氨酸，用以除去封头试剂。室温放置两天，再重蒸两次。重蒸液小量分装，4℃ 冰箱保存。

6. Edman 降解手工操作法

(1) 偶合反应

称取 150nmol 蛋白质样品置于 10ml 尖底磨口试管中，用 0.4ml，0.4mol/L DMAA 缓冲液，pH9.0，溶解样品（DMAA 即 N，N-dimethyl N-allylamine），也可用 N-甲基吗啉（N-methyl-morphonine）缓冲液代替。具体配法是，浓 DMAA 为 9mol/L，以吡啶/水 = 3/2 体积比为溶剂，用 TFA 调 pH～9.5 再用吡啶/水稀释至欲配溶液的体积。然后，加 0.06ml PITC 后，通氮气，盖紧磨口塞，摇匀，置于 50℃ 水浴，保温 30 分钟。反应毕，反应液用 3ml 苯洗涤，共 5 次。每次摇匀，抽提，离心 2500 转/分钟，3 分钟，弃去上清液，经洗涤后的下层水相用氮气吹干或置于真空干燥器内干燥。

(2) 裂解

偶合后的样品，加入 0.5ml 无水三氟醋酸、通氮气，盖紧磨口塞，充分摇匀。样品全部溶解后，置于 50℃ 水浴中，保温 10—15 分钟，然后通氮气吹干或置于真空干燥器内干燥。

(3) 抽提

经裂解后的样品加 0.6ml 水，摇匀，将样品溶解，加 2ml 醋酸乙酯抽提，离心 2500 转/分钟，3分钟。上层有机相收集于试管中，下层水相再重复抽提两次，合并三次抽提上相溶液，用氮气吹干，下层水相用氮气吹干后进入第二轮反应。

(4) 转化

上相抽提物加 0.4ml1mol/L 盐酸，使样品溶解，置于 80℃ 水浴，保温 10 分钟，待样品冷却后，加入 1.5ml 醋酸乙酯抽提，离心，2500 转/分钟 3 分钟，共抽提三次，合并上层有机

相,通氮气吹干后,留待鉴定。水相溶液内含 PTH-Arg; PTH-His; 及 PTH-CysO₃, 如在有机相检测不到 PTH-氨基酸, 则必须检查该一步的水相样品内是否含上述三个氨基酸之一。

(5) 鉴定

上层样品用少量醋酸乙酯溶解, 点样在 E. Merck 荧光硅胶板走单相层析鉴定。利用各种 PTH-氨基酸在溶剂中展开的先后次序(Rf 值不同)不同来确定。但用一种溶剂常常还不能使 18 种天然氨基酸全部展开,还须改换层析溶剂系统再次鉴定。所以每次鉴定必须走二个单相层析。若欲鉴定的氨基酸在水相中,则还需走第三个单相层析。

层析溶剂系统:

第一相　氯仿:乙醇 = 98:2

第二相　氯仿:乙醇:甲醇 = 88.2:1.8:10

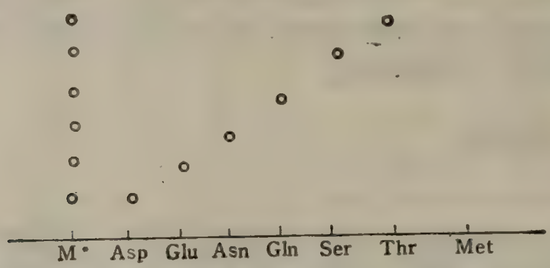
第三相　(甲)　吡啶:醋酸:水 = 4:1:1

　　　　(乙)　醋酸丁酯:异丙醇 = 10:4

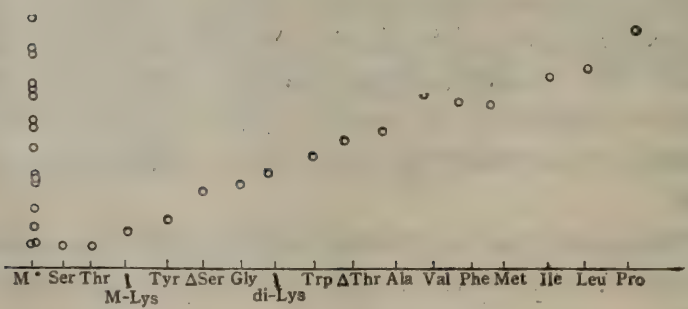
　　　　　　　取(甲)溶剂 3ml 加(乙)溶剂 7ml 混匀。

层析分配图谱

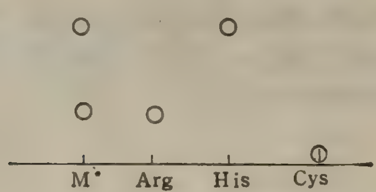
第一相:



第二相:



第三相:



M* 为已知混合 PTH-氨基酸。

每次层析时，必须同时跟随标准混合 PTH-氨基酸一起展开。层析后，吹去有机溶剂，层析板在 254nm 紫外灯下检测，画出与标准 PTA-氨基酸相对映的斑点，进行比较，就能得出欲鉴定的样品是那一个氨基酸。有些 PTH-氨基酸在二个相溶剂中都能展开，所以，可以将二个相展开图谱进行比较鉴定。将每步降解的 PTH-氨基酸逐个鉴定就能得出从 N-端开始的蛋白质多肽链的序列。高效液相色谱法（HPLC）鉴定 PTH-氨基酸，既可定性又可定量测定，是最精确的方法，如实验室有条件，应尽量采用。

应用 HPLC 仪器鉴定 PTH-氨基酸的方法，各生产仪器的公司均有说明书介绍。应用于蛋白质一级结构测定也有许多报道[3,4]。本文仅简单介绍[5]，Beckman 公司产品 HPLC Model 165 检测器在 254nm 及 269nm 下，定量测定 15 种 PTH-氨基酸的方法。

层析条件:

层析柱: 4.6mm × 15cm ultrasphere ODS

流速: 1.0ml/min

洗脱溶剂:

易动相: (A) 50mmol/L 醋酸钠，pH5.2。

(B) 50mmol/L 醋酸钠于水:甲醇:正丙醇（40:50:10）pH3.0 混和溶剂中。

当柱平衡至 20%（B）时，开始进行梯度。

洗脱条件:

time (min)	function	value	duration (min)
0	%B	65%	25
38	%B	20%	2

样品浓度:

约 15μg/ml PTH-氨基酸，除 PTH-Histidine 是 1.5 μg/ml。

PTH-氨基酸	254nm[图1]	269nm[图2]
1. Asp	69	112
2. Asn	55	92
3. His	8	12
4. Glu	93	145
5. Gln	86	149
6. Ala	79	125
7. Tyr	46	71
8. Pro	58	72
9. Met	48	76
10. Val	75	124
11. Trp	83	129
12. Phe	26	37
13. Ile	70	115
14. Leu	34	51
15. NorLeu	43	67

样品注射体积：20μl。

记录纸速度：0.25cm/min。

鉴测：0.1 AUF。

测得的 PTH-氨基酸峰形顺序：Asp、Asn、His、Glu、Gln、Ala、Tyr、Pro、Met、Val、Trp、Phe、Ile、Leu、NorLeu。峰高（mm）在 0.1 AUF。

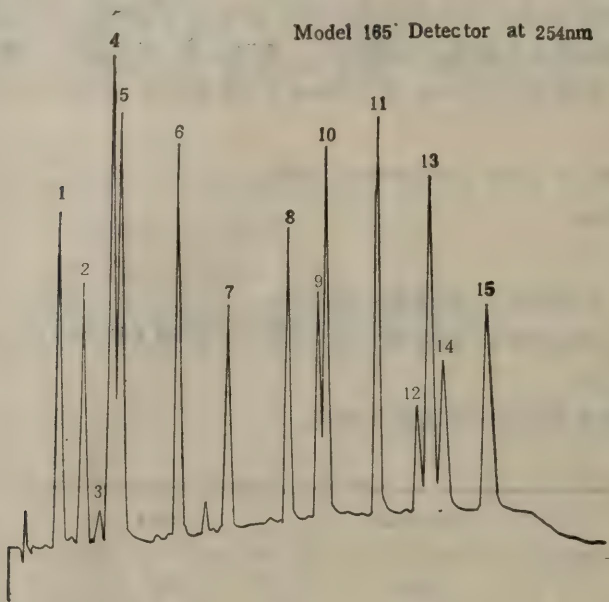


图 1

7. 应用固相序列仪测定蛋白质或多肽的氨基酸序列

70 年代，LKB 公司试制了固相顺序仪。它是一台自动测定蛋白质或多肽的氨基酸序列而设计的仪器。操作原理是建立在 Edman 降解的一系列化学反应上，实际上，所研究的蛋白质或多肽样品是共价结合到一种惰性支持体上——APG(3-amino-propyl-glass)，随后装入一根小口径的反应柱中，用作 Edman 降解的试剂以后逐个用泵打入柱中，顺次释放出单个氨基酸衍生物，把它们分别收集起来，再进行转化，层析鉴定(方法同手工操作)。

(1) 仪器组装

按图 3 所示。

仪器共分三个主要部分：(1) 电子部分，负责运转信号，由程序卡片指令。(2) 机械部分，由五个泵，负责所有溶剂的运载工作，(3)柱、恒温装置及部分收集器。每释放一个氨基酸衍生物大约需 80 分钟，根据蛋白质中所含氨基酸性质不同，顺序卡片可以人工编排来控制反应的速度。

(2) 蛋白质或多肽样品与固相载体（APG）的连接

a. 称取 300nmol 样品，置于磨口尖底管中，以 Edman 试剂首先将蛋白质或多肽的 N-端氨基酸的氨基进行保护。

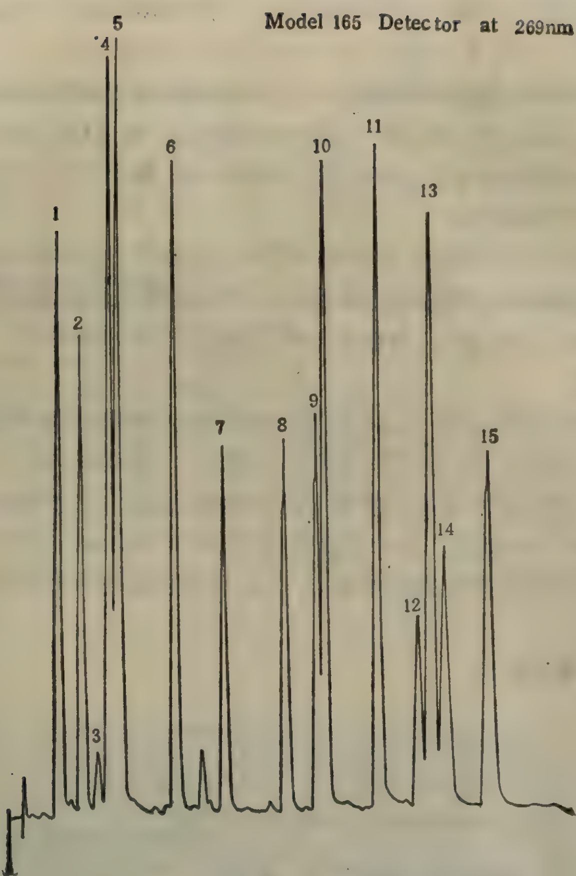


图 2

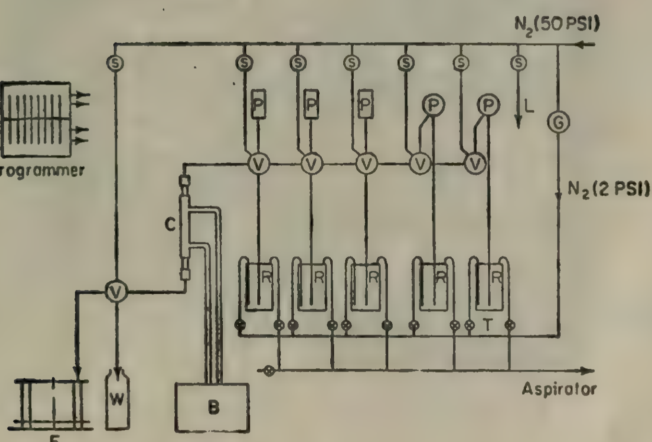


图 3

图3说明：Programmer，程序控制仪；Aspirator，出气器；B，恒温水浴；
C，柱；F，部分收集器；G，运载高纯氮器；P，泵；R，溶剂贮存瓶。

b. APG 处理。APG 在联接前必须预先处理除去不结合的部分。称取 180mg APG（LKB 公司产品）、置于 4 号砂芯漏斗中，用 5ml 1mol/L 吡啶-盐酸 pH5.0，洗涤二次，

每次溶液保留 5 分钟，抽去。再用水洗 5 次，抽干。用 DMF 浸泡二次，每次 5 分钟，抽去溶液，APG 待用。

c. 联接 3mg EDC(N-ethyl-N-dimethylaminopropylcar bodiimide, E. Merck 产品)溶于 0.5ml DMF 中，然后，加入样品管中，使样品溶解，并与 EDC 相联。然后慢慢加入经处理过的 APG 与样品溶液混合，通氮气，盖紧磨口塞，置于 37℃ 水浴中，保温 3 小时，不时搅动，然后，37℃ 保温过夜。

次日，加 0.25ml N-甲基吗啉及 0.05ml PITC，通氮气、在 50℃ 水浴保温 30 分钟。使 APG 上的多余氨基封头。将联接上样品的 APG 转移至砂芯漏斗中，用甲醇浸洗 5 次，抽干，醋酸乙酯浸洗 2 次，抽干，待载体干燥后，装入仪器的柱中。

(3) 仪器的运转

共 5 个贮存溶剂瓶、如图 3 所示，从右开始，分别装入甲醇、二氯甲烷、缓冲液(0.4mol/L DMAA pH8.4)，PITC (5% PITC，DMF 溶液)、三氟醋酸。在正常运转前必须将各瓶充满氮气，然后，按控制程序卡片上的指令进行实验，仪器可以不停地循环，直到序列测不出为止。每次循环约 80 分钟。与手工操作相同，由于 Edman 反应不能每步 100% 完全及系列中不是绝对无氧而产生的副反应。所以应用仪器也只能一次连续测定 30 步氨基酸序列。

(4) 固相仪正面图(图 4)

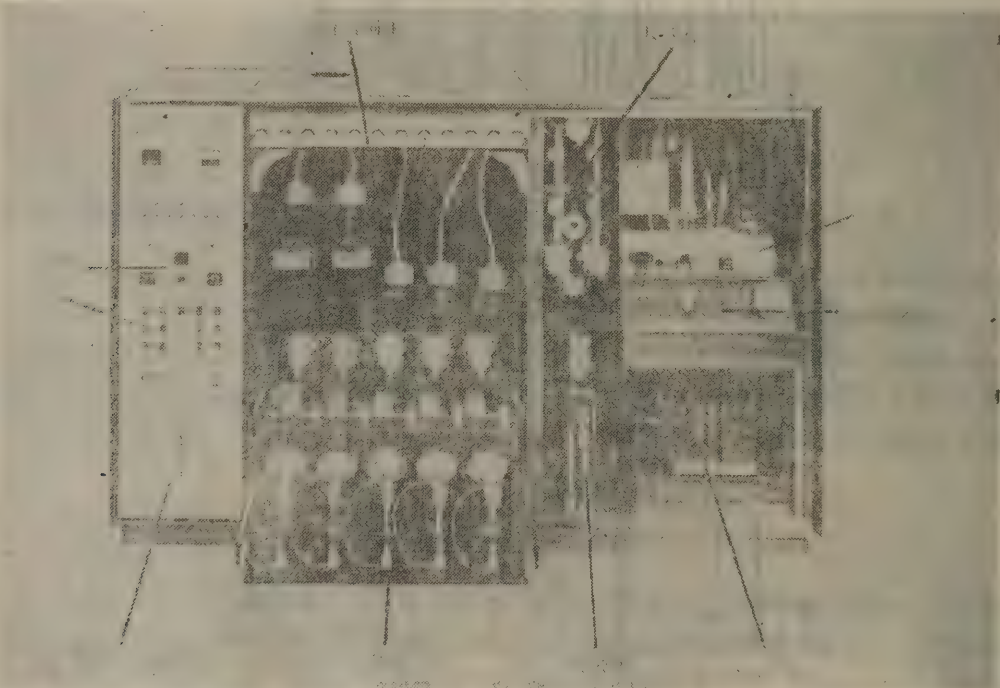


图 4　LKB 4020 序列仪(正面观)

以上介绍的应用 Edman 降解手工及仪器操作测定蛋白质氨基酸序列方法。虽然具有优越性，但由于所需测定的样品量大及一次只能连续测定近 30 步氨基酸序列。所以测定分子量较大的蛋白质的一级结构仍存在许多困难。近年，曾报道了应用 DABITC/PITC

双偶合微量液相测定[6]，可使样品微量化及用样品固相化，并应用双偶合法进行降解、可能使测定序列延长[7]。目前，国际上最先进的气、液、固微量序列仪，可使用 Pmol 水平的样品，一次连续降解 60—70 步氨基酸序列[8]。其基本原理仍建立在 Edman 降解的一系列化学反应上。

参　考　文　献

[1] G. Allen, Sequencing of proteins and peptides, 1981.
[2] 成久俊等，科学通报，1986 年第 8 期。
[3] A. S. Bhown and J. C. Bennett, *Anal. Biochem.*, **137** (1984), 256—260.
[4] R. Knecht, *Anal. Biochem.*, **130** (1983), 65—71.
[5] Beckman 公司，PTH-Amino Acid Analysis.
[6] Chang, J. Y. et al., *FEBS Lett.*, **93** (1978), 205--214.
[7] 林南琴等，生物化学与生物物理学报，1984 (**16**)，6。
[8] Hewick, R. M. et al., *J. Biol. Chem.*, 1981, **256** (15), 7990—7997.

4-N, N-二甲胺基偶氮苯-4′-异硫氰酸酯（DABITC）蛋白质微量序列分析

钱瑞卿

（中国科学院上海有机化学研究所）

在蛋白质化学中对多肽氨端残基作逐步序列降解的反应已被广泛地采用，其中用得最普遍和最成功的应数 Edman 降解[1]。目前它既可用手工方法[2]，又可用自动的步骤[3]进行。新近发展的序列仪[4]虽然已能对皮摩尔量的多肽作高效的自动序列降解，但是微量的手工序列分析当前仍被许多实验室普遍而有效地采用着。

1976 年 Chang 等人[5]提出用一种有色的 4-N，N-二甲胺基偶氮苯-4′-异硫氰酸酯（DABITC）试剂作蛋白质序列分析，它能使降解释放的氨基酸形成红色的衍生物（DABTH），后者易于用薄层层析鉴定、灵敏度高。也有人提出用其他改进的 Edman-型试剂作肽的序列降解[6]，但是现在已经清楚，凡是在异硫氰酸苯酯（PITC）的苯环上带有庞大体积取代基团的 Edman-型试剂，它们与肽的氨端残基的偶联产率要比用 PITC 反应的降低很多，以至难于被实际采用。就像 DABITC 试剂，它在通常反应条件下的偶联产率仅约60％。这就要求反应物在用酸进行裂解之前必需先被 PITC 再偶合一次，使剩余未偶合的氨端残基尽可能地被偶联完全，以避免在序列降解过程中出现严重的残基残留现象。这就是 DABITC/PITC 双偶合法的原理。

自从 DABITC/PITC 双偶合步骤被发展为纳摩尔水平的蛋白质序列技术[5]以来，许多实验室都先后采用这一技术取代以往所用的直接手工 Edman 或 Edman-Dansyl[7]技术，后者曾一度被广泛地用于肽的半微量序列分析，可是 Dansyl-肽在酸水解时不可避免地会引起谷氨酰胺与天冬酰胺侧链脱酰胺和色氨酸破坏，这是它的缺点。手工微量 DABITC/PITC 双偶合序列分析技术还具有下述优点：(1) 它很容易被一般实验室所采用，设备简便，化学试剂费用低廉，并易于被初学者所掌握。(2) 它可同时作多个样品的顺序分析，这就有可能在不太长的时间内测得一系列由蛋白质的酶解或化学降解产生的肽碎片的氨端序列。(3) 它对被分析肽的长度与疏水性的要求较低，有些不适合于在序列仪中分析的肽，也可用手工 DABITC/PITC 双偶合技术进行测定。(4) 它可作纳摩尔肽的顺序分析，因此从纤维素薄层双向指纹图谱[5]上洗脱下来的，或从高效液相层析上收集的纯肽碎片，一般可直接被 DABITC/PITC 双偶合技术测定序列。

由于上述优点，我们在测定天花粉蛋白一级结构时也普遍地采用这一技术。在本节中我们将叙述 DABITC/PITC 的手工双偶合方法，包括它在固相载体上进行多肽序列降解[8]的应用。

一、材　　料

为了使蛋白质和多肽的序列测定能取得最理想的结果，所用的化学试剂和设备都有

一定的要求。

1. 化学品

(1) DABITC* 从东风生化试剂厂(中国上海), Fluka (瑞士), Pierce (美国), BDH(英国)或Polysciences(美国)等公司得到的新鲜制备的试剂是暗棕色的结晶,可直接用于序列分析。久置的试剂可用下述重结晶法进行纯化: 1g 试剂溶于 80ml 沸腾的丙酮中,少量不溶物趁热用玻璃砂芯漏斗滤去,滤液置于冰箱中冷却析出深棕色片状晶体,滤集并立即真空干燥之,一般可得 0.6—0.7g 固体, m.p. 168—170℃。固体试剂在充氮 −20℃ 下贮藏。用作微量手工序列分析时可先将 1.41mg DABITC (5μmol/L) 溶于 1ml 丙酮中,然后分装于 25 支毛细管中(每支 40μl, 即 200nmol/L), 先置于真空干燥器中用水泵减压抽去大部分丙酮,然后再用油泵真空干燥,在氮气流下封管,并于 −20℃ 保存。使用时再溶于 40μl 吡啶中**。

(2) PITC 分析用的 PITC 在减压、充氮下重蒸一次,将馏分分装在充氮的毛细管中(每管 20μl)于 −20℃ 下保存。

吡啶 分析纯吡啶先用氢氧化钾 (10g/l) 回流 2 小时,蒸出,再用茚三酮 (1g/l) 回流 2 小时,蒸出,最后再用氢氧化钾 (10g/l)回流,收集 b.p. 114—116℃ 的馏分。

(3) 三氟乙酸 化学试剂三氟乙酸用少量铬酐回流后、重蒸,再用硫酸钙干燥,重蒸,收集 b.p. 72—73℃ 的馏分。

正庚烷、乙酸乙酯、乙酸正丁酯、乙醇和丙酮均为分析纯溶剂***。

薄层层析用的溶剂也是分析纯的,水是两次重蒸的。

(4) 序列测定用试管 通常对 1—10nmol/L 肽的分析,可采用内径为 6mm,长为 50mm 带玻璃磨口塞的锥形底小试管(图 1a),如分析的量更少,则可采用更小的序列测定管。

电加热器: 可采用中国科学院上海分院科学仪器厂制造的 WKJR-1 型或相似性能的温控加热器。

(5) DABTZ 转化管 可采用带盖的 4 × 40mm 的聚丙烯管 (图 1b)。

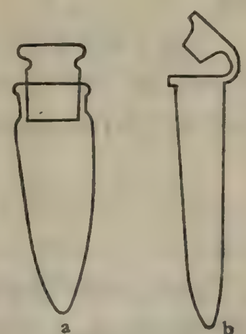


图1 序列分析试管 a. 与 DABTZ 转化管 b.

二、 标准 DABTH 衍生物的制备

(1) α-DABTH 衍生物 称取氨基酸 0.5mg 溶于 100μl pH~10.5 的 Et_3N-HOAc 缓冲液**** (0.5ml Et_3N+ 5ml 0.2mol/L HOAc + 50ml 丙酮 + 50ml 水), 并加入 50μl DABITC 的丙酮溶液 (4nmol/L/μl), 于 54℃ 反应 50 分钟,真空干燥,然后再加入 100μl 50% 三氟乙酸于 54℃ 保温 45 分钟, 再真空干燥,抽干的氨基酸的 DABTH 衍生

* DABITC 是一种致癌试剂,操作时请带橡皮手套,不要直接与皮肤接触。

** DABITC 在吡啶中不稳定,因此切勿将 DABITC 配成吡啶溶液贮存!

*** 它们对 Tollen 与 KI/淀粉试剂呈阴性反应,否则也要进行去醛与去过氧化物的处理。

**** 当 His、Asp 与 Glu 溶解时pH会下降,这时需用 1mol/L NaOH 调节溶液的 pH 至 ~10, 然后再加入 DABITC。

物可在 −20℃ 冰箱中保存备用。

(2) α-DABTH-ε-DABTC-Lys 的制备 称取 H-Lys-Asp-OH 二肽(40nmol/L)溶于 100μl 水中,并与 200μl DABITC 的吡啶溶液 (10nmol/L/μl) 在 70℃ 反应 50 分钟,用 4 × 500μl 庚烷-乙酸乙酯 (2:1 V/V) 抽提去除过量的试剂*,水相真空干燥,固体溶于 100μl 50% 三氟乙酸,并在 54℃ 反应 45 分钟,再真空干燥,抽干的样品于 −20℃ 保存备用。

(3) 标记化合物的制备 在 500μl 50% 吡啶中加入 30μl 二乙胺,30μl 乙醇胺,和 330μg DABITC(1000nmol/L),在 54℃ 反应 50 分钟,真空干燥后取少量溶于 80% 乙醇中,于 −20℃ 保存备用。

三、手工液相 DABITC/PITC 双偶合

从高效液相层析或指纹图谱上收集得到的纯肽 (1-10nmol/L) 在序列测定管(内径为 0.6cm,长 5cm 带玻璃磨口塞的尖底试管)中真空干燥,加入 80μl 50% 吡啶与 DABITC 的吡啶溶液(新鲜配制的 10nmol/L/μl) 40μl, 充氮盖塞后在 54℃ 保温 50 分钟,进行第一次偶合;开塞加 10μl 纯的 PITC, 并充氮盖塞后再在 55℃ 保温 30 分钟作第二次偶合。序列管中过量的试剂和副产物用 4 × 120μl 庚烷-乙酸乙酯 (2:1 V/V) 提取**(用振荡器混和,再离心加速分层),每次提取时用滴管小心吸去有机相,最后一次提取后的水相用真空干燥***。抽干的残余物加入 50μl 三氟乙酸、充氮盖塞后在 55℃ 保温 10 分钟作裂解反应,真空抽去三氟乙酸****,然后加 80μl 水入试管,并用 3 × 120μl 乙酸丁酯提取释放的 DABTZ 衍生物,留在水相中氨端减少一个氨基酸残基的肽立即冻干,用作下一步降解。

乙酸丁酯的提取液(黄色)经真空干燥后,用 50μl 50% 三氟乙酸水溶液于 55℃ 处理 45 分钟,使 DABTZ 转化为相应的 DABTH,然后真空干燥,残渣溶于 ~1μl 80% 乙醇中,作薄层层析或高效液相层析鉴定用。

四、固相 DABITC/PITC 降解

肽的固相序列分析包括两个主要步骤:(1)将肽共价联接到固相载体上。(2)固相肽的序列分析。其中第一步的成功与否是固相序列分析的关键,对于不同类型的肽已发展了各种合适的固定化方法[9],限于篇幅这里只能扼要叙述几个常用的固定化方法。

1. 利用 Lys 的 ε-NH_2 将肽联在 DITC-玻璃珠上

将肽 (5—10nmol/L) 加入固相序列管(图 2)中,真空干燥后,溶于 400μl 0.2mol/L

---

* 有些疏水性肽在用 2:1 或 3:1 (庚烷:乙酸乙酯 V/V)提取时,易产生沉淀物悬浮于水相与有机相之间,切勿吸去!

** 有些疏水性肽在用 2:1 或 3:1 (庚烷:乙酸乙酯 V/V)提取时易悬浮于两相之间形成沉积物,切勿弃去!

*** 避免样品溅出而损失。

**** 一般在作手工 DABITC/PITC 双偶合时,用两只真空干燥器为宜,即一个是抽酸的,如抽 T. F. A., 50% T. F. A. 或乙酸丁酯提取液的抽干用,另一个是抽碱的,即抽水相的真空干燥用。切勿要混用。

$NaHCO_3/NaOH$ pH～9.0(如肽的溶解度差也可用 pH9.5 的 N-甲基吗啉/三氟乙酸缓冲液)缓冲液中，取出 1/10 作微量氨基酸分析用，再往管中加入用甲醇预洗过的 DITC-玻珠（10mg），脱气、充氮，并在 50℃ 电磁搅拌 1 小时进行固定化。过量的—NCS 用乙醇胺（20μl）饱和掉(50℃ 保持 15 分钟)，然后用水(2ml)，甲醇（2ml）分别洗涤玻璃珠，真空干燥。

2. 利用 C-端羧基将肽联在固相上

将肽（5—10nmol/L）加入固相序列管中，真空干燥后加入 100μl 无水三氟乙酸，充氮加塞后在室温放置一刻钟，真空抽干样品后加入 EDC（2mg）的二甲基甲酰胺(200μl)溶液与用甲醇预洗的氨基玻璃珠（APG，10mg），脱气充氮后于室温搅拌 30—60 分钟，使固定化。反应后的玻珠分别用水（2ml）与甲醇（2ml）洗两次，固相上过量的氨基相继用 PITC（20μl）的二甲基甲酰胺(100μl)溶液和吡啶(50μl)的二甲基甲酰胺(200μl)溶液在 50℃ 反应 20 分钟进行封闭。玻珠再用二甲基甲酰胺（2μl）与甲醇（2μl）分别洗两次后真空干燥。

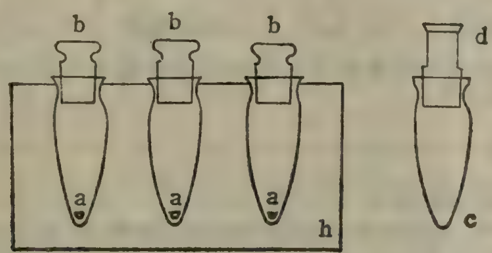


图 2　适用于手工固相 DABITC/PITC 降解的装置
a. 电磁搅拌子；h. 电热板(可调温)；b. 玻璃磨口盖子；c. 序列管；d. 带玻璃砂芯的盖子(每当抽真空时带上 d，以免载体损失)

3. 利用羧端的同型丝氨酸（Hse）内酯将肽联在固相上

将含 Hse 的肽（5-10nmol/L）加入固相顺序管中，经 P_2O_5 干燥器中真空干燥后，加入 300μl 无水三氟乙酸，充氮加塞后在室温放置 1 小时，使 Hse 完全转化为它的内酯。再抽真空干燥，样品溶于 300μl 二甲基甲酰胺中，加入 10mg 氨基玻璃微珠和 50μl 三乙胺，去气充氮后在 45℃ 反应 2 小时。离心弃去溶剂，玻珠经真空干燥，过量的氨基用 PITC 偶合饱和，因此肽的氨端第一个残基不能以 DABTH 鉴出。

五、手工固相 DABITC/PITC 双偶合步骤

(1) 双偶合　往上述联接肽的固相载体(～10mg)的固相序列管中加入 200μl 水、200μl 吡啶和 200μl DABITC 的吡啶溶液（2.3mg/ml），加入小磁鱼，充氮加塞后在 55℃ 搅拌 50 分钟，再加入 PITC 30μl，充氮后在 55℃ 搅拌 30 分钟，离心移去过量的试剂，并用 2 × 500μl 吡啶与 2 × 500μl 甲醇分别洗涤和真空干燥。

(2) 裂解　真空干燥后的残渣加入 200μl 三氟乙酸，充氮加盖后在 55℃ 反应 10

分钟，真空抽去过量的三氟乙酸。

(3) **转化** 降解释放的 DABTZ 用 2×400μl 甲醇提取，洗剩的玻珠真空干燥后作下一步偶合用，合并甲醇提取液，真空抽去甲醇后加入 50% 三氟乙酸，充氮加塞后于 55℃ 转化 45 分钟，真空抽干后作层析鉴定用。

六、 DABTH 衍生物的鉴定

1. DABTH 用双向薄层层析鉴定

图 3 是 27 个 DABTH-氨基酸衍生物在聚酰胺薄膜（Schleicher & Schüll）上的双向层析谱。在谱中除了 DABTH-Leu-5 DABTH-Ile 不能被分离外*，其他 DABTH 衍生物，包括 Lys，Ser 与 Thr 的副产物都能被分离**。在层析中为了便于斑点的确认，还引入两个内标化合物 DABTC-二乙胺与 DABTC-乙醇胺，它们经双向层析后分别处于膜的中部呈蓝色斑点，与 DABTH 的红色斑点不同，很容易分辨。其他 DABTH 就可根据它们与内标的相对位置来确定。

在分析鉴定时，将上述从降解中得到的 DABTH 溶于 1—5μl 乙醇中，并用毛细管或微量移液管吸取试液（通常为 0.5～1μl）点在聚酰胺膜（2.5 × 2.5cm）的左下角（点样时直径不超过 1mm 为宜），用气流吹干后再在相同位置点一次内标液，再吹干，用下述溶剂展开双向上行层析***:

1. 第一向: 醋酸:水 (1:2 V/V)
2. 第二向: 甲苯:正己烷:醋酸 (2:1:1 V/V/V)

第一向层析展开后需吹干，再在它的垂直方向作第二向展开，第二向溶剂展开，干燥后，薄层用 HCl 蒸汽熏一下(不要使膜与 HCl 液体接触而使层析谱损坏)，原来膜上的黄色斑点会显出红色或蓝色。然后与标准层析谱比较，读出相应的氨基酸。双向层析一般在 10 分钟内可完成。

2. DABTH 的反相 HPLC 鉴定

DABTH 的反相 HPLC 可以在可见范围（极大吸收在 420nm 处）检出，灵敏度为 pmol 水平。

图 4 显示了 DABTH 在ultrasphere 反相柱上的 HPLC[11] 谱，所有的 DABTH 在一次梯度或 isocratic 洗脱中得到分离。商品 ultrasphere 柱对 DABTH-Arg 和 DABTH-His 的洗脱时间有时有些起伏，它可通过改变缓冲液的盐浓度来调节。

七、评　　注

虽然 DABTH 分析鉴定的灵敏度为 pmol 水平，但在实践上这么微量肽的降解循环的重复性产率是很低的，而且试剂中含有的杂质也会干扰分析。目前，我们对 1—5nmol 肽，作 10 至 20 步顺序分析是没有太大困难的。如果序列分析的肽少于 1nmol

* DABTH-Leu 与 DABTH-Ile 可用一相甲酸-乙醇 (10:9V/V) 上行层析[10]分离。

** Lys 可出现三个不同颜色的衍生物，α-DABTH-ε-DABTC-Lys（紫色），α-PTH-ε-DABTC-Lys（蓝色）和 α-DABTH-ε-PTC-Lys（红色）。

*** 保证层析的重复性，展开溶剂均为新鲜配制。

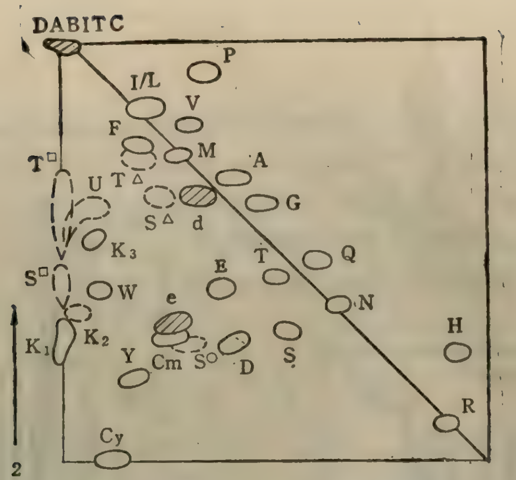
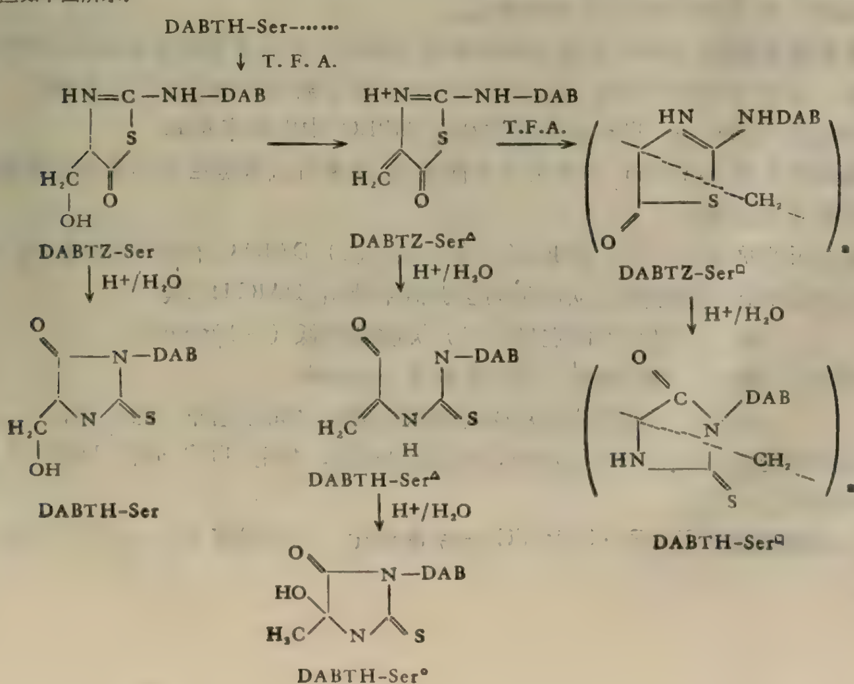


图3 27 种氨基酸的 DABTH 衍生物在聚酰胺薄层(2.5×2.5 厘米)上的双向薄层层析

第一向：醋酸-水（1:2，V/V）为展开剂

第二向：甲苯-正己烷-醋酸（2:1:1，V/V/V）为展开剂。图中实线表示 HCl 熏后现红色的斑点，虚线表示蓝色斑点 d，e 分别为内标二乙胺与乙醇胺的 DABTC-衍生物。r 为 DABITC，u 是一蓝色副产物，N，N-二甲胺偶氮苯-N-苯基硫脲。S△、S□、S○、T△ 和 T□ 是 DABTH-Ser 和 DABTH-Thr 的副产物*；K_1 是 α-DABTH-ε-DABTC-Lys；K_2 是 α-PTH-ε-DABTC-Lys；K_3 是 α-DABTH-ε-PTC-Lys；Cy 是 DABTH-$CySO_3H$；Cm 是羧甲基半胱氨酸的 DABTH；P 为 DABTH-Pro；L/I 是 DABTH-Leu (Ile)；V为 DABTH-Val；F 为 DABTH-Phe；W 为 DABTH-Trp；M 为 DABTH-Met；A 为 DABTH-Ala；G 为 DABTH-Gly；E 为 DABTH-Glu；T 为 DABTH-Thr；Q 是 DABTH-Gln；Y 为 DABTH-Tyr；D 是 DABTH-Asp；S 是 DABTH-Ser；N 是 DABTH-Asn；H 是 DABTH-His 和 R 为 DABTH-Arg。

* 用三氟乙酸处理时经常会出现 Ser 与 Thr 的失水反应，从而形成多个产物，以 Ser 为例就有产物 DABTH-Ser，DABTH-Ser△（失水产物），DABTH-Ser□（失水后再聚合）与 DABTH-Ser°（失水后再加水）。其反应如下图所示：



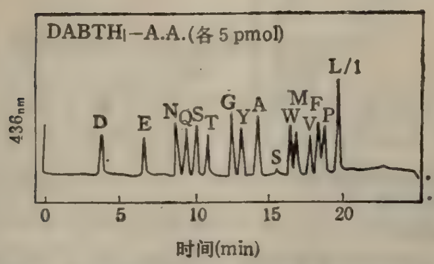


图 4a 标准氨基酸的 DABTH 的 HPLC 分离

梯度洗脱溶剂A是 0.035mol/L 醋酸钠，pH,5.0；溶剂B是乙腈。梯度是 45—70% B/O—10min 从 10—14min 保持 70% B，70—80% B/14—16min，16—22min 保持 80% B。然后 80—45% B/22—26min 柱是 Zofbax-ODS. 温度 22℃ 流速 1ml/min，λ= 436nm，0.005AUFS。

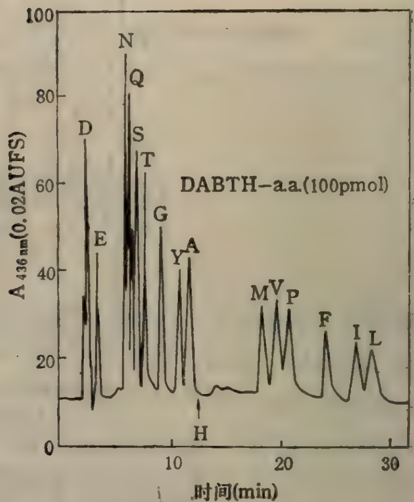


图 4b DABTH-氨基酸用反相 HPLC 的 isocratic 分离

层析柱用 Hypersil MOS 5μm 为载体 柱长 250×4mm。 流速 1.2ml/min； 温度为 45℃ 洗脱溶剂为 12m mol/L 醋酸钠 (pH5.0)/乙腈/二氯乙烷 (50:50:0.5V/V/V) 检出波长为 436nm。

则所用的顺序分析管要更小些，对试剂与溶剂纯度的要求更高。

在高效真空系统下，一般完成一步 DABITC/PITC 双偶合，需要 2.5 小时，因此一个熟练的操作者可在一天同时对 8—10 个样品作两步 DABITC/PITC 双偶合降解分析。使手工序列分析的效率赶上甚至超过自动序列仪。

采用双内标的双向薄层层析使 DABTH 较容易被辨认。但对于初学者来说用未知样品与已知的 DABTH 共层析，对判断未知 DABTH 也是有帮助的，尤其像对 Phe，Vol，Leu/Ile 的 DABTH 衍生物的确定。

大多数氨基酸的 DABTH-衍生物在反相 HPLC 柱上都有重复性的阻留时间，比较容易确定，但对 DABTH-His 与 DABTH-Arg 往往需用标准共层析才能确定。从双偶合降解中释放的 Ser 与 Thr 衍生物往往在 HPLC 中出现多重峰。

上述两种分析 DABTH 的方法各有优缺点，读者可以根据自己的条件任意选用。但一般说来有下列比较：

薄层层析的优点 (1) 简便、经济和有效；(2) DABTC 衍生物(蓝色)与 DABTH 衍生物(红色)不同的色泽便于从污染的层析谱中读出 DABTH 来。

缺点：(1) 不能定量 (2) 灵敏度较低 (～10pmol)

HPLC 的优点：(1) 定量 (2) 灵敏 (～1pmol)

缺点：不易区分氨基酸与氨基污染物之间在色泽上的差异。

大量实验的经验说明，对于没有明显背景的短肽，单用 TLC 分析 DABTH 也产生很可靠的结果。

(1) 液相和固相 DABITC/PITC 方法的对比 到目前为止，由于不是每一个肽

都能被高产率地联接在固相载体上，因此液相 DABITC/PITC 方法是一种远比固相法更为有用的技术。一般对手头上很少量的肽 (1～2nmol)宁可选用液相法分析它，而不愿因遭到不完全的联接而损失掉。可是固相法确有其自身的优点。例如：(1) 它允许非常亲水的氨基酸残基，如半胱磺酸或与 Asn 联接的糖的提取与直接的鉴定，而它们在液相序列分析中往往出现空白。(2)它可使过量的试剂彻底洗去，这在液相方法中有时是难以达到的。

参 考 文 献

[1] Edman, P., *Arch Biochem.*, **22**, 475(1949).
Acta Chem. Scand., **4**, 283(1950).

[2] Edman, P & Sjoquist, J., *Acta Chem. Scand.* **10**, 1507(1956).

[3] Edman, P & Begg, G., *Eur. J. Biochem.*, **1**, 80(1967).

[4] Hewick, R. M., Hunkapiller, M. W., Hood, L. E. & Dreyer, W. J., *J. Biol. Chem.*, **256**, 7990(1981).

[5] Chang, J.-Y., Creaser, E. H. & Bently, K. W., *Biochem. J.*, **153**, 607(1976).
Chang, J.-Y., Brauer, D., & Wittmann-Lcebold, B., *FEBS Lett.*, **93**, 205(1978).
Chang, J.-Y., *Biochem. Biophys. Acta.*, **578**, 188(1979).
Chang, J.-Y., *Biochem. J.*, **199**, 557(1981).

[6] L'Italien, J. J. & Kent, S. B. H., *J. Chromatogr.*, **283**, 149(1984).

[7] Gray, W. R., "Methods in Enzymology", vol. 25, part B, pp. 121, 333, New York, Academic Press (1972).

[8] Laursen, R. A., *Eur. J. Biochem.*, **20**, 89(1971).

[9] Laursen, R. A., "Methods in Enzymology" vol 47, part E p. 277, New York, Academic Press (1977).
Allen, G., "Sequencing of Proteins and Peptides", p. 208, Elsevier/North-Holland, Amsterdam, (1981).

[10] Yang, C. Y., *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **360**, 1673(1979).

[11] Chang, J.-Y., *Biochem. J.*, **199**, 557(1981).
Wittmann-Liebold, B., Kimura, H. & Kimura, M., "Advanced Methods in Protein Microsequencing Analysis", p. 78, Springer-Verlag, (1986).
Lehmann, A & Wittmann-Liebold, B., *FEBS Lett*, **176**(2), 360(1984).

超离心分析法测定分子量

许秋萍　程伊洪
（中国科学院上海生物化学研究所）

超离心分析法是利用具有光学监测系统的分析超离心机进行的。在50至60年代中超离心分析法是测定生物大分子分子量的主要方法，与后来发展的凝胶电泳测定分子量方法不同，它不需要已知分子量的参考标准，此外在研究分子之间的相互作用方面，超离心分析法至今仍是十分有用的。

关于超离心分析法的基本原理和应用已有较详细的介绍[1-6]，读者可以参考，这里不再重复。下面介绍实际测定蛋白质分子量的两种基本超离心分析法，即沉降速度法和沉降平衡法。

一、沉降速度法测分子量

对于含有均一溶质的溶液，或含有少数几种分子量有明显差别的溶质的溶液，可应用沉降速度法结合扩散系数，根据 Svedberg 公式测定分子量 M：

$$M = \frac{RTS}{D(1-\bar{V}\rho)} \tag{1}$$

上式中R为气体常数，T为绝对温度，S为生物大分子的沉降系数，D为扩散系数（测定方法见辅助实验1），$\bar{V}$为微分比容（测定方法见辅助实验2），ρ为溶剂密度，应用这公式时要注意S和D值都有浓度依赖性，应使用无限稀释时的外推值。

若已知蛋白质的S、D和$\bar{V}$值，即可利用上式计算分子量。如果蛋白质是简单的球形分子，虽然没有测定D值，也可利用已知蛋白质的S值与分子量的关系式估算其分子量（见附录1）。

下面先介绍生物大分子的沉降系数 $S^0_{20,w}$ 的测定：

1. 样品准备

超离心分析的理论依据是以不带电荷的颗粒作为模型，而大部分生物大分子在水溶液中处于离子状态，因此有必要在溶剂中添加小分子中性无机盐以减弱蛋白质或核酸等生物大分子的离子电荷效应。一般在溶剂中加入中性盐，如0.1到0.2mol/L NaCl即可，或所用的溶剂已是具有0.1至0.2mol/L离子强度的缓冲液．配制成的样品溶液可对溶剂透析平衡．对不纯样品更是需要，因为借此可减少样品中的小分子杂质，以避免干扰正确测定大分子的浓度。透析外液可作为参考液用（如装入双扇形槽离心池的参考液孔中），或作为合成界面池中的上层液用。

为了便于计算，溶剂可选用常用的溶剂，例如磷酸缓冲液，Tris-HCl 缓冲液等。这

些溶剂的粘度和密度有现成的资料可查(见附录2)。

所配制的蛋白质样品浓度可在 1mg/ml 至 0.5mg/ml。为便于用紫外光学系统检测,样品溶液在波长 280nm 的光吸收 A_{280} 可选在 0.2 至 0.7 之间。

2. 转速的选择

对待测样品,可先估计其沉降系数的大致范围,然后参考表1,选择适当的转速:

表1 转速的选择

沉降系数S	转速(rpm)
≤5	>50000
10	50000
20	35000
30	28000
40	25000
50	22000
100	15000

3. 离心池的选择

离心池由离心筒、中心片、石英窗、螺丝及垫圈等部件装配组成。其中心片用各种不同的材料制成。例用铝、Kel-F、Epon-充碳、Epon-充铝等。不同材料制成的中心片、承受的最大转速和耐化学腐蚀性不同。实验时,根据样品需要的转速和化学性质选择合适的中心片既能耐化学腐蚀又能达到需要的转速。中心片的型式又分为单扇形槽型、双扇形槽型(如图1)和合成界面型(如图2)。但最常用的是双扇形槽型。双扇形槽离心池也有不同的容积(见表2),0.48ml 为最常用,容积大透光距离长的双扇形槽片适用于浓度稀的样品。

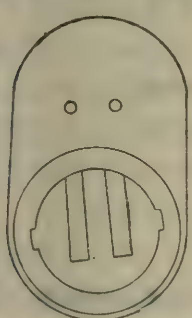
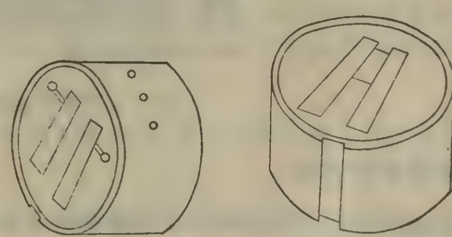


图1 双扇形槽离心池



(a) 具有加液小室的合成界面池
(b) 具有毛细沟的合成界面池
图2 双槽合成界面池

表2 离心池扇形盛液槽的容积

	(1)	(2)	(3)
盛溶液的总容积(ml)	0.48	0.72	1.20
溶液透光距离的长度(mm)	12	18	30

离心池选择好后，仔细检查每个部件是否完好，然后按照分析超离心机说明书的操作规程安装、紧固、加液、平衡离心池，并把离心池和平衡池装入分析转头内。

4. 扫描记录沉降界面

把转头装于转轴上，按照操作规程预定温度（如果样品对温度无特殊要求，为了便于校正至标准温度，可直接选用 20℃）和预选转速。机器起动后，加速到预定的转速时，即可启用紫外光扫描装置扫描，在记录仪图纸上记录离心池内大分子样品沉降的情况。在离心力作用下，离心池中溶液的浓度发生变化，产生浓度梯度 dc/dx，并出现溶剂与溶液的界面，扫描记录的浓度分布曲线。

开始 5 分钟扫描 1 次，观察沉降界面移动速度。此时还可适当调节转速，使在 60 分钟内样品的沉降界面线能达到离心池的中部，在确定转速后，立即每隔 3 分钟或更长的时间扫描 1 次，共 10 次左右。

如果所用分析超离心机拥有其他光学检测装置，则溶质在沉降过程中出现溶剂和溶液的界面，可以观察和记录到如图 3 的各种图象。

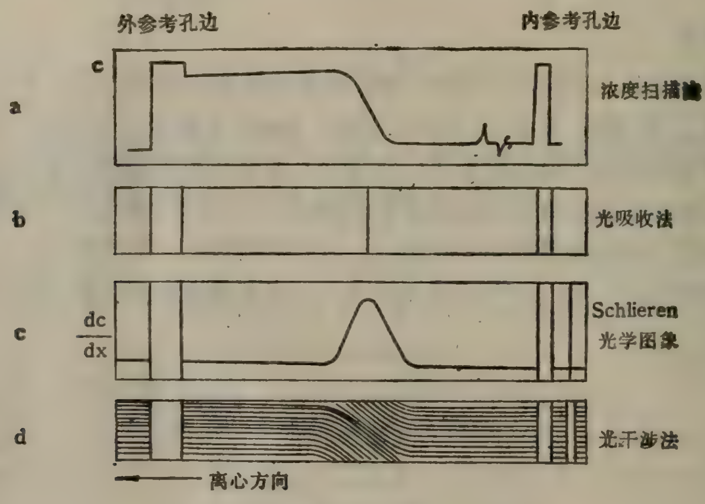


图 3 不同光学系统测得沉降界面的图象

5. 沉降系数的计算

溶质分子的沉降系数是代表溶质分子在单位离心力场中的沉降速度，可以用下式表示

$$S = \frac{dr/dt}{\omega^2 r} = \frac{d\ln r}{dt} \cdot \frac{1}{\omega^2} = \frac{d\ln r}{dt'} \cdot \frac{1}{\omega^2 60} \qquad (2)$$

沉降系数的量纲为秒，一般蛋白质沉降系数的数量级为 10^{-13} 至 10^{-12}，故习惯以 Svedberg [S] 单位表示，即 $1S = 10^{-13}$ 秒。

上式中 ω 是角速度(弧度/秒) $\left(即\ \frac{2\pi}{60} \times N，N 为每分钟转数\right)$，r 是界面中心至转轴中心的距离 (cm)，在记录图上可以测量到不同时间扫描的 r 值，t 及 t′ 为时间，分别

以秒及分钟表示。若以 $\ln r$ 作为纵坐标，t' 作为横座标作图，所得直线斜率即为 $\frac{d\ln r}{dt'}$，代入上式便可计算沉降系数。

6. 将 S 实验值校正至标准条件

因为沉降系数与温度溶剂的粘度和密度有关。为便于比较，需要把 S 的实验值校正至特定的标准条件（20℃，溶剂为水）的 $S_{20,w}$ 值，即

$$S_{20,W} = S_{实验}\left(\frac{\eta_{t,Solv}}{\eta_{20,W}}\right)\left(\frac{1-\bar{V}_{20,W}\rho_{20,W}}{1-\bar{V}_{t,Solv}\rho_{t,Solv}}\right) \tag{3}$$

上式中 S 代表测得的沉降系数，η 代表粘度（脚注 t 代表实验温度，20 代表 20℃，W 代表水，Solv 代表溶剂），粘度的测定见辅助实验 3，$\bar{V}$ 代表溶质的微分比容，ρ 代表溶剂密度。

7. 为校正溶液浓度对 S 值的影响

常测定一系列不同浓度溶液的 S 值。溶液浓度可选择在光吸收 A_{280} 0.1 至 1.0 之间，然后外推至 0，得到 $S^0_{20,w}$ 的值。

若待测样品的沉降系数较小（如 $S^0_{20,w} < 3$），而离心转速又小于 60000rpm，最好选用合成界面池（图 2）。因为它能迅速使溶剂与溶液人为地合成界面，便于测量界面的移动。否则对于分子较小的样品，容易扩散，界面也易消失，就难于测量。

此外也可利用密度梯度超离心分析法，以已知沉降系数的同类型生物大分子作为校正标准，可相对地比较，用以测定生物大分子的沉降系数。

8. 以测定猪甲状腺球蛋白为例具体说明

其样品浓度为 0.16%，溶剂为磷酸缓冲液（0.06mol/L Na_2HPO_4、0.094mol/L KH_2PO_4、0.043mol/L NaCl、pH5.76）。离心条件为：34856 转/分、温度 20℃、利用 Beckman 公司生产的 L5-75B 型超离心机进行实验。离心池的安装、充液及平衡已如前节所述。在达到预定转速后不久，每隔 3 分钟扫描 1 次，得到 11 张不同时间的扫描图，对记录图（以图 2 为例）的测量步骤如下：

（1）测量记录仪上的离心池底部的外参考孔线 R_b 至离心池顶部的内参考孔线 R_t 之间的距离为 20.1cm。

（2）扫描图放大倍数 F 的计算。因 R_b 至 R_t 之间的实际距离为 1.62cm（由厂家提供的），故 $F = \frac{20.1}{1.62} = 12.41$。

（3）测量界面中心，即浓度中点（见图 2）到 R_t 的距离 x，加上 R_t 至转轴中心的实际距离 5.70cm（由厂家提供的），即得到界面中心至转轴中心距离 r，即 $r = \frac{x}{F} + 5.70$（cm）。

（4）依据每隔 3 分钟扫描 1 次的记录图，测定 11 次的不同时间界面中心至转轴中心的移动距离 r（见表 3）。

表 3　猪甲状腺球蛋白扫描图 r 值测量表

次数	时间(分)	x(cm)	$r = \frac{x}{F} + 5.70$ (cm) 界面中心至转头中心距离	lnr
1	0	5.85	6.1714	1.8199
2	3	6.25	6.2036	1.8251
3	6	6.55	6.2278	1.8290
4	9	6.95	6.2600	1.8341
5	12	7.3	6.2882	1.8386
6	15	7.65	6.3164	1.8431
7	18	8	6.3446	1.8476
8	21	8.3	6.3688	1.8516
9	24	8.65	6.3970	1.8558
10	27	9	6.4252	1.8602
11	30	9.35	6.4534	1.8646

以 lnr 作为纵座标，时间 t′（分钟）作为横坐标作图（见图 4）。

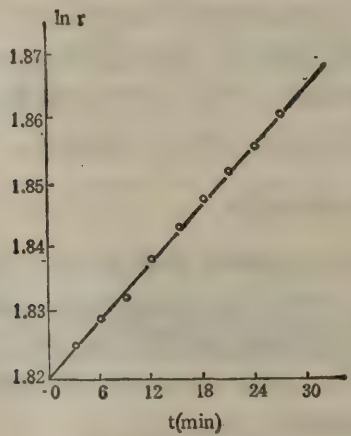


图 4　lnr 对 t′ 作直线图

（5）应用最小二乘法求最佳直线:

$y = bx + a$　$a = 1.8205$、 斜率 $b = 1.4784 \times 10^{-3}$　回归系数 $= 0.9997$

（6）代人公式（2）计算 S 值:

因为转速为 34865rpm

故　$\omega = 0.10472 \times 34865 = 3651.06$ 弧度/秒

$$S_{实验} = \frac{d\ln r}{dt'} \cdot \frac{1}{\omega^2 60}$$

$$= \frac{1.4784 \times 10^{-3}}{(0.10472 \times 34865)^2 \times 60} = 18.48 \times 10^{-13} \text{ 秒}$$

（7）校正至标准条件:

已知 $\rho_{20,w}=0.9982\text{g/cm}^3$，甲状腺球蛋白的 $\bar{V}$ 为 0.72，所用的溶剂为磷酸缓冲液可在常用溶剂表中（见附录 2）查到 $\frac{\eta_{20,Solv}}{\eta_{20,w}}$ 约为 1.035、$\rho_{20,Solv}$ 约为 1.0097g/cm^3。

故

$$S_{20,w}=S_{实验}\frac{\eta_{20,Solv}}{\eta_{20,w}}\frac{(1-\bar{V}_{20,w}\rho_{20,w})}{(1-\bar{V}_{t,Solv}\rho_{t,Solv})}$$

$$=18.48\times1.035\times\frac{1-0.72\times0.9982}{1-0.72\times1.0097}=19.7\times10^{-13}\text{秒}$$

因为本实验样品浓度为 0.16%，已很稀，基本趋向于零浓度故可略去浓度校正。

对已从实验测得 S 值的样品，如果扩散系数 D 已知，或已从实验测得即可计算分子量。以猪甲状腺球蛋白为例：其 $S^0_{20,w}$ 已校正为 19.7×10^{-13} 秒。已知其扩散系数 $D^0_{20,w}=2.65\times10^{-7}\text{cm}^2/\text{秒}$，$\bar{V}=0.720\text{cm}^3/\text{g}(20℃)$，$T=273.2+20=293.2°\text{K}$，$R=8.314\times10^7$ 尔格/度 · 摩尔，$\rho_{20,w}=0.9982\text{g/cm}^3$，把上述参数代入公式（1）：

$$M=\frac{RTS}{D(1-V\rho)}=\frac{8.314\times10^{+7}\times293.2\times19.7\times10^{-13}}{2.65\times10^{-7}(1-0.72\times0.9982)}$$
$$=64.4206=6.44\times10^5$$

二、沉降平衡法测分子量

沉降平衡法自 1950 年后期发展以来特别受到重视，现在也是鉴定蛋白质分子量的重要方法之一。也可以说是测定大分子量最为可靠的方法。通常由于达到平衡的时间较长，不利于不稳定的材料。但应用短液柱离心，结合优良的光学系统和分析方法，可缩短达到平衡的时间。例如对于分子量在 20 000 至 70 000 之间的生物大分子（许多蛋白质包括在这范围内），达到平衡的时间只需数小时。对于近 500 000 的较大分子，则需 1—2 天也已够。

这个方法的主要优点是有热力学理论为依据的坚实基础。除了可以测定单分散体系，即仅含一种溶质分子的均匀体系中的溶质分子量，还可鉴定蛋白质多分散体系中的分子量分布。沉降平衡法也是研究大分子相互作用的一个有力研究手段。

从沉降和扩散相平衡的原理推导出计算溶质分子量M的公式为：

$$M=\frac{RT}{(1-\bar{V}\rho)\omega^2}\cdot\frac{d\ln c}{dr^2}\tag{4}$$

上式中 R 为气体常数，T 为绝对温度，$\bar{V}$为溶质的微分比容，ρ 为溶剂的密度，ω 为角速度，c 为溶液浓度，r 为平衡图上浓度分布曲线各点至转轴中心距离。

如果 c 又以离心机光学系统所测量的光吸收 A 代表，则上式中 $d\ln c$ 可改写为 $d\ln A$。

从上式可以看出，通过超离心的沉降平衡实验得到平衡图后，从中测量到 A 和 r 值，然后以 $\ln A$ 对 r^2 作图，所得直线斜率代入上式，即可计算分子量。

若实际所作图不是直线，则表明溶质分子是不均一的。曲线上每点的斜率将比例于池内溶液中每点溶质分子的平均分子量。

沉降平衡实验的具体步骤如下：

1. 离心池装液准备

待测分子量的蛋白质样品溶液浓度，范围内取光吸收 $A_{280}=0.2$ 至0.3之间(～0.5mg/ml)。对缓冲液透析平衡后，备用。仍选用双扇形槽离心池（见图 1)。 在右槽中预先装氟化碳油 0.03ml，然后加入 0.12ml 样品溶液。在左槽中加入 0.17ml 溶剂，最好是用样品透析后的外液。

2. 达到平衡时间的估计

离心池中加样量的多少决定液柱的长度，后者则决定达到平衡的时间。从下式可估计达到平衡的时间(误差小于 0.1%)：

$$t_{0.1\%}=0.7(b-a)^2/D \tag{5}$$

上式中 b 是离心池样品溶液底部至转轴中心的距离， a 是液面至转轴中心的距离，(b－a)代表液柱的长度，D 为扩散系数。从上式可知液柱越短则平衡时间越少。故用短液柱可缩短达到平衡的时间，但随之误差也增大，故有一定的限度。

3. 所需达到平衡转速的选择

实验前若能大致推测待测蛋白质样品的分子量（MW)，则可利用下式估算所需转速(rpm)：

$$\log(\mathrm{rpm})=6.34-0.496\log(\mathrm{mw}) \tag{6}$$

或从下图查得。

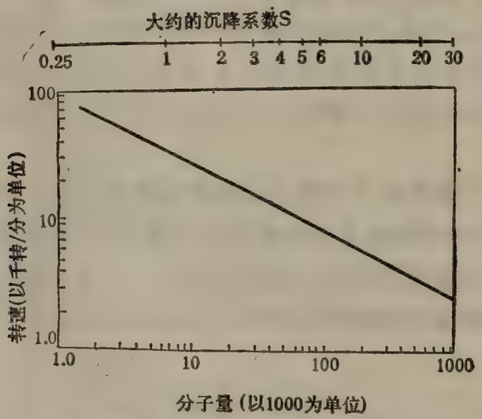


图 5 沉降平衡法中分子量和平衡转速图

4. 平衡浓度分布曲线的记录

沉降平衡实验开始 $t=0$，离心池整个溶液的起始浓度均一不变，随着时间的增长 t_1 至 t_2 溶质分子下沉，使近液面的浓度减少，而底部浓度增加，如图 6 所示。因此出现浓度梯度而发生反向扩散作用。选择合适的转速后，经过一段时间，溶质向底部移动的量等于向液面扩散的量而趋向于平衡。最后当 $t=\infty$ 时，得到的平衡浓度分布曲线是理论上需要得到的。

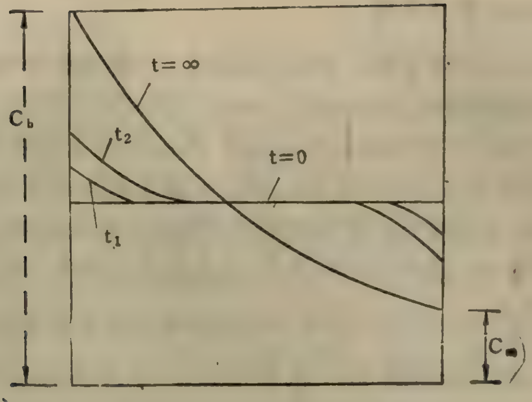


图 6　溶质浓度分布曲线随时间变化情况

实际上最终的热力学平衡状态是达不到的，那是需要无限长的时间，但是采用合适的实验条件，在经过一段时间后，能基本上达到与最终平衡条件相一致的结果。如果所得实验平衡图与理论上最终平衡图之间的误差小于测量误差，则此实验平衡图可当作沉降平衡实验的最终平衡图。

为有效减少达到平衡时间，可采用高速技术。即先用 1.5—2 倍于预选平衡转速，离心2— 3 小时，使离心池底部溶液的浓度 C_b四 倍于液面的浓度 C_m。然后减速到预选平衡速度离心 2—3 小时，仔细观察在预选平衡速度下，浓度分布曲线是否有下沉或上浮现象。若有，则略调整一下转速使其成为需要的平衡速度，即可在此平衡速度下运行。如果浓度分布曲线的形状在 4—6 小时不变，就作为实验平衡图记录下来以备测量用，见图 8。

为避免溶液中其他紫外光吸收物质影响浓度测定，为能正确计算分子量，确定零浓度基线是很重要的。在达到平衡和浓度分布曲线已记录后，则可加速至转头和离心池所允许的最高转速，连续离心数小时。使溶质大分子下降，在液面出现上清层。然后减速至平衡速度，立即扫描浓度分布曲线，上清层的扫描底线即为整个离心池溶液的基线。以此作为零浓度的基线，把它画到平衡扫描图上(见图 7)，作为测量浓度光密度的基准。

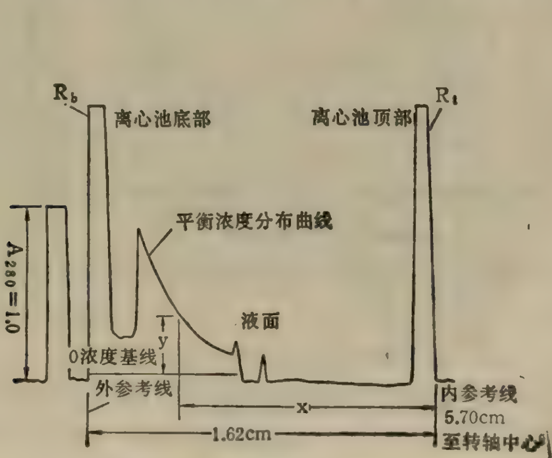


图 7　沉降平衡浓度分布曲线扫描图

5. 测量平衡浓度分布曲线计算分子量

以测定牛血清白蛋白分子量为例，加以具体说明。取纯的干燥的牛血清白蛋白 0.32mg 溶于 0.5ml 磷酸缓冲液中（0.1mol/L NaCl、0.006mol/L Na_2HPO_4、0.002mol/L KH_2PO_4），配成浓度为 0.064% 的溶液。把氟化碳、样品溶液和缓冲液分别加入离心池的双扇形槽中，按照前面所述的方法进行实验。确定平衡速度为 11 093 转/分后。再离心 6 小时得到沉降平衡浓度分布曲线图。最后把测得的零浓度基线画在沉降平衡图上。

在沉降平衡图上测量离心池外参考孔线 R_b 至内参考孔线 R_t 之间的距离为 20.5cm，并计算放大倍数 $F=\frac{20.5}{1.62}=12.65$。设 x 为浓度分布曲线上各点至内参考孔线 R_t 的距离，故各点至转轴中心的实际距离 $r=\frac{x}{F}+5.70$。设 y 为浓度分布曲线上各点到零浓度基线的高度。故各点光吸收 A 以在扫描图上光吸收 $A_{280}=1.0$ 的实测高度 13.1cm 为计算单位，得 $A=\frac{y}{13.1}$。各参数的计算数据如表 4：

表 4　牛血清白蛋白沉降平衡图 r 值和 A 值测量表

x	$\frac{x}{F}$	$r=\frac{x}{F}+5.70$	r^2	y	$A=\frac{y}{13.1}$	lnA
12.2	0.9644	6.6644	44.41	1.2	0.09160	−2.3903
12.7	1.0039	6.7039	44.94	1.65	0.1259	−2.0718
13.2	1.0434	6.7434	45.47	2.15	0.1641	−1.8071
13.7	1.0830	6.7830	46.01	2.85	0.2175	−1.5253
14.2	1.1225	6.8225	46.54	3.4	0.2595	−1.3488
14.7	1.1620	6.8620	47.08	4.7	0.3587	−1.0250
15.2	1.2015	6.9015	47.63	6.4	0.4885	−0.7163
15.7	1.2411	6.9411	48.17	8.3	0.6335	−0.4563
16	1.2648	6.9648	48.51	10.8	0.8244	−0.1930

以 lnA 为纵坐标，r^2 为横坐标作图，并用最小二乘法作出最佳直线如图 8。

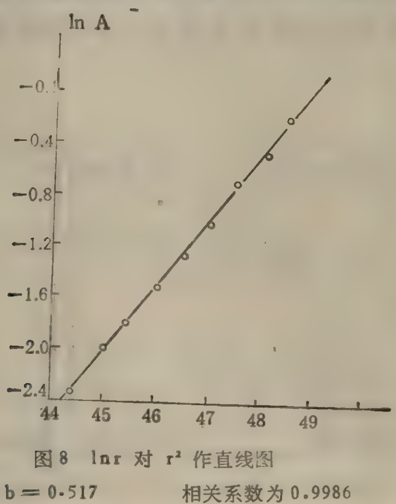


图 8　lnr 对 r^2 作直线图

斜率 b = 0.517　　　　相关系数为 0.9986

因为 $\omega=0.10472\times11093$ 转/分 = 1161.6 弧度/秒

$R = 8.314 \times 10^7$ 尔格/度·摩尔

$T = 273.2 + 20 = 293.2K$

$\bar{V} = 0.72$ （见辅助实验 2 实例）

$\rho = 1.0039$ （见辅助 2 实验 2 实例）

将上述数据代人公式（4）计算牛血清白蛋白的分子量：

$$M = \frac{2RT}{(1-\bar{V}\rho)\omega^2} \cdot \frac{d\ln A}{dr^2}$$

$$= \frac{2 \times 8.314 \times 10^7 \times 293.2}{(1-0.72 \times 1.0039) \times (1161.6)^2} \times 0.517$$

$$= 67390 = 6.74 \times 10^4$$

三、辅 助 实 验

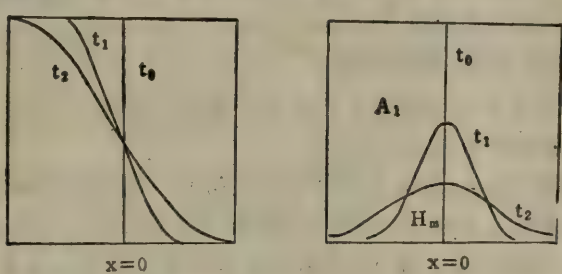
1. 辅助实验 1：扩散系数的测定

Fick 定律指出，在一定的温度和压力条件下，溶质的扩散速率与其浓度梯度 $\frac{dc}{dx}$ 和横过界面的面积成比例关系，其比例常数 D 称为扩散系数，单位是 cm^2/s。

人为界面的合成可利用 Tiselius 电泳仪或分析超离心机备有的合成界面池（图 3）两者均能使溶液与溶剂形成清晰的交界面。在扩散的过程中，则可利用光学系统观察和记录溶质分子的扩散情况（如图 9 所示）。如果仪器记录的是一系列浓度分布的微分曲线，（这是 Schlieren 光学系统所记录的高斯型曲线，图 9b）就可利用 Fick 定律推导的扩散公式求 D：

$$D = \frac{A^2}{H_m^2 4\pi t} \tag{7}$$

上式中 A 为扩散微分曲线下峰形面积，H_m 为峰的最高值，t 为扩散的时间。以 A^2/H^2 对 t 作图，可得直线斜率为 $4\pi D$，从而可求得 D 值。



(a)浓度分布的积分曲线　　(b)浓度分布的微分曲线

图 9　溶质的扩散浓度分布图象

如果仪器所记录的是一系列浓度分布的积分曲线，可利用机率单位计算法求得标准差 σ，即可利用下式求 D 值[5]：

$$D = \sigma^2/2t \tag{8}$$

上式中 t 为扩散时间，以 σ^2 对 2t 作直线图，即可从其斜率计算 D 值。

溶质分子扩散时，虽受到重力的作用，但对大多数蛋白质尚不足于使之重新分布。因为热能所引起的布朗分子运动大大超过重力的影响，故蛋白质分子仍能进行随机分布的

自由扩散。在离心力场中，低速影响较小。例如对沉降系数为 5S 的蛋白质分子，在 10000rpm 离心 4 小时，可引起D值 0.4% 的误差，可以忽略不计。但当转速增加时，则影响加大。

为了把D的实验值校正至标准条件的 $D_{20,w}$（温度为 20°，溶剂为水）可依据下式计算：

$$D_{20,w} = D_{实验}\frac{273+20}{273+t}\frac{\eta_t}{\eta_{20,w}} \tag{9}$$

上式中 t 为实验温度，η_t 为溶剂在实验温度时的粘度，$\eta_{20,w}$ 是水在 20℃ 时的粘度。

严格地讲，大分子溶质的扩散系数并不是一个常数，在恒温和恒压下它可能随浓度而变化。一般是在一定浓度范围内取其平均值。如果要求零浓度的D值，可以不同浓度所测定的D值对浓度作图，取其零浓度时的外推值。

2. 辅助实验 2：微分比容的测定

计算分子量及沉降系数校正至标准条件，都需要沉降物质的微分比容 $\bar{V}$ 数值。蛋白质的微分比容约等于其比容，即其干燥物质密度的倒数。严格地说微分比容应是 1g 溶质溶于大容积溶剂中所发生的容积变化。

最通常是应用比重瓶称量密度的经典方法测定 $\bar{V}$。这种方法最简单，最节约，可利用一般实验室的设备。但缺点是需要样品量多和费时间。

经比重瓶称量溶剂和溶液密度后，可依据下式计算溶质的实验微分比容[4]：

$$\phi = [V - (1-W)V_0]/W \tag{10}$$

上式中 W 是溶质的重量百分数，$V = \frac{1}{\rho}$ 是溶液的比容，$V_0 = 1/\rho_0$ 是溶剂的比容。

以测定牛血清白蛋白（BSA）的微分比容为例。取纯化的牛血清白蛋白干粉，放在真空干燥器中（放置 P_2O_5），反复干燥，然后在分析天平上称量至恒重，得 155.05mg。用定量移液管加 15.24ml 磷酸缓冲液（0.1mol/L NaCl、0.006mol/L Na_2HPO_4、0.002mol/L KH_2PO_4）配制成约 1% 浓度 BSA 溶液。

在恒温室（18—19℃）内分析天平与清洁干燥的比重瓶（12ml）在恒温中平衡 1 小时，带手套取空比重瓶称量为 17.0543g。

加重蒸水至比重瓶，加盖，使水充满盖中的毛细管，避免瓶内产生气泡。把比重瓶放入恒温水浴(20°±0.05℃)，平衡 15 分钟，用纸擦干从毛细管溢出的水分。从水浴取出比重瓶，擦干外部，在恒温室内平衡 20 分钟，使瓶外部水分全部蒸发掉。因室温稍低于 20℃，比重瓶内水容积缩小。可导致盖内毛细管中水柱下降。

然后称得盛有水的比重瓶重量 = 29.6556g。

故瓶内水重 = 29.6556 − 17.0543 = 12.6013g

因为 20℃ 时水的密度 = 0.99823g/ml

故比重瓶的容积 = 12.6013 ÷ 0.99823 = 12.6236ml

把比重瓶内水倒去，烘干，冷后，放在恒温室内平衡 15 分钟，如前法装入溶剂。

称得盛有溶剂的比重瓶的重量 = 29.7274g

故瓶内溶剂重 = 29.7274 − 17.0543 = 12.6731g

计算溶剂的密度 = 12.6731 ÷ 12.6236 = 1.0039g/ml

还是用同一个比重瓶，按前法处理后

称得盛有 BSA 溶液的比重瓶重 = 29.7630g

故瓶内 BSA 溶液重 = 29.7630 − 17.0543 = 12.7087g

计算 BSA 溶液的密度 = 12.7087 ÷ 12.6236 = 1.0067g/ml

注意以上称量在恒温室进行，湿度为 60%

BSA 溶液重量百分比计算：

$$\frac{\text{溶质 (BSA) 重量}}{\text{溶剂重量} + \text{溶质重量}} \times 100\% = \frac{0.15505}{15.24 \times 1.0039 + 0.15505} \times 100\%$$

$$= 1.003\%$$

依据 10 式计算 BSA 的实验微分比容：

$$= [V - (1 - W)V_0]/W$$

$$= \left[\frac{1}{1.0067} - (1 - 0.01003) \times \frac{1}{1.0039}\right] \Big/ 0.01003$$

$$= 0.72 g/ml$$

从以上计算可知欲求得正确的微分比容，需用容积 10ml 以上的比重瓶，并称准至 0.1mg。溶质称准至 0.01mg，有必要时对称量可进行空气浮力校正，校正值在小数点第五位数字上。

很多蛋白质微分比容在较低的实验浓度范围内几乎与浓度无关，故实验微分比容即为其微分比容。一般应用 10—25ml 的比重瓶称量 3—4 个不同浓度的蛋白质溶液，即可求得其平均 V。

此外蛋白质样品的氨基酸组成已经知道，也可以从氨基酸的微分比容汁算样品的微分比容。

3. 辅助实验3：粘度的测定

为了校正 S 实验值至标准条件(温度为 20℃，溶剂为水)的沉降系数 $S_{20,w}$，需要分别测定溶剂和水在实验温度和 20℃ 时的粘度。

最简便的方法是应用奥氏毛细管粘度计，(图 10) 测定粘度[4]。将粘度计垂直架在恒温水浴中保温至需要温度，温度测准至 ±0.05℃，用定量移液管取 5ml 溶剂从加液口加入粘度计底部，在恒温水浴中平衡 20 分钟。在毛细管上端管口用吸力将溶剂吸至 x_0 刻度，然后使液柱自然下降，待液柱上端到 x_1 刻度时，立即开始用秒表计时，待至 x_2 刻度时停止记时。

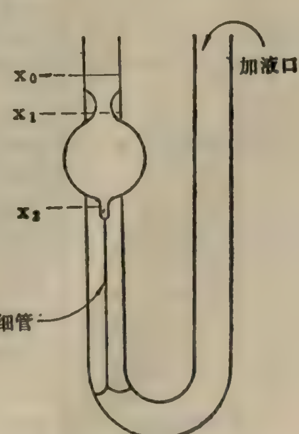


图 10 奥氏毛细管粘度计

因为液体的粘度 η 与毛细管中流过的时间 t 及所加水柱压力 P 成正比而 P 又与液体的密度 ρ 成正比，故液体的粘度可用下式表示

即 $$\eta = k\rho t \qquad (11)$$

上式中 k 为仪器常数，若用同一粘度计在相同条

件下测定一种溶液和水的粘度比：

$$\frac{\eta_{t,Solv}}{\eta_{t,w}}=\frac{k\rho_{Solv,t_1}}{k\rho_{w,t_2}}=\frac{\rho_{Solv,t_1}}{\rho_{w,t_2}} \tag{12}$$

例在温度 20℃ 测定磷酸缓冲液 PBS（0.1mol/L NaCl 0.002mol/L KH_2PO_4、0.006mol/L Na_2HPO_4）流过毛细管的时间为 $t_1=92.3$ 秒，原已测 $\rho_{solv}=1.0039$，测定蒸馏水流过毛细管的时间为 $t_2=91.6$ 秒，又知 $\rho_{20,w}=0.99823$ 故

$$\frac{\eta_{20,Slov}}{\eta_{20,w}}=\frac{\rho_{Solv,t_1}}{\rho_{20,w,t_2}}$$

$$=\frac{1.0039\times 92.3}{0.99823\times 91.6}=1.0133$$

附录1 生物大分子的分子量与沉降系数的经验关系式

大分子	缓冲液	关系式	分子量范围
蛋白质	中性	$S=0.00242M^{0.67}$	10^4—10^7
天然 RNA	中性	$S=2.61+0.022M^{0.45}$	—
线型天然 DNA	中性	$S=2.8+0.00834M^{0.475}$	10^6—10^8
环型天然 DNA	中性	$S=2.7+0.01759M^{0.445}$	10^6—10^7
超螺旋天然 DNA	中性	$S=7.44+0.00243M^{0.58}$	10^6—10^7
单链 DNA	中性	$S=0.0105M^{0.549}$	10^6—10^8
单链 DNA	碱性	$S=0.0528M^{0.4}$	10^6—10^8
染色质	中性	$S=0.011M^{0.554}$	—

附录2 盐的水溶剂 $\rho_{t,Solv}=\rho_{t,w}+\Delta\rho$ 和 $\eta_t/\eta_{t,w}$ 表

盐	mol/L	$\Delta\rho$				$\eta_t/\eta_{t,w}$			
		20℃	25℃	30℃	40℃	20℃	25℃	30℃	40℃
NaCl	0.10	0.0041	0.0041	0.0041	0.0040	1.009		1.009	1.010
	0.20	0.0083	0.0082	0.0081	0.0080	1.017		1.019	1.021
	0.50	0.0204	0.0202	0.0200	0.0196	1.042		1.049	1.054
	1.00	0.0403	0.0399	0.0395	0.0389	1.089		1.101	1.111
	2.00	0.0788	0.0780	0.0774	0.0763	1.208		1.255	1.241
	3.00	0.1160	0.1149	0.1140	0.1127	1.366		1.382	1.397
KCl	0.10	0.0050				0.994	0.998		
	0.20	0.0090				0.991	0.996		
	0.50	0.0250					0.994		
	1.00	0.0490					0.991		
	2.00	0.0990					1.004		
KH_2PO_4	0.01		0.0010			1.003			
	0.10		0.0098			1.029			
	0.20		0.0193			1.058			
	0.50		0.0469						
Na_2HPO_4	0.01			0.0014				1.007	
	0.10			0.0141				1.066	
	0.20			0.0281				1.132	

附录2 （续）

盐	mol/L	Δρ				η_t/η_{tw}			
		20℃	25℃	30℃	40℃	20℃	25℃	30℃	40℃
NaH_2PO_4	0.01	0.0008				1.003			
	0.10	0.0079				1.030			
	0.20	0.0158				1.061			
	0.50	0.0404				1.182			
	1.00	0.0789				1.409			
醋 酸	0.01	0.0000				1.001			
	0.10	0.0008		0.0008	0.0005	1.012			
	0.20	0.0018		0.0017	0.0015	1.023			
	0.50	0.0043		0.0040	0.0036	1.057			
	1.00	0.0086		0.0079	0.0071	1.119			
	2.00	0.0168		0.0154	0.0140	1.257			
	3.00					1.418			
醋酸钠	0.01	0.0004				1.004			
	0.10	0.0043				1.036			
	0.20	0.0086				1.073			
醋酸锌	0.10	0.0055				1.025			
	0.20	0.0095				1.055			
	0.50	0.0255				1.135			
	1.00	0.0495				1.255			
	2.00	0.103				1.54			
Na_2CO_3	0.01	0.0011		0.0106	0.0106	1.005			
	0.10	0.0109				1.049			
$Na_2B_4O_7$	0.01			0.0019				1.009	
	0.10			1.0187				1.086	
HCl	0.01	0.0002					1.001		
	0.10	0.0018					1.007		
	1.00	0.0179					1.061		
NaOH	0.10	0.0046				1.023			
	0.20	0.0090				1.045			
	0.25					1.056			
柠檬酸钠	0.01	0.0020				1.010			
	0.10	0.0195				1.101			
	0.20	0.0382				1.209			
Tris-HCl (pH8)	0.1		0.0075			1.030			
	0.2		0.0146			1.077			
	0.5		0.0390			1.231			
D_2O	体积百分比								
	30		0.0322				1.068		
	50		0.0537				1.118		
	60		0.0645				1.137		
	67		0.0716				1.153		
	75		0.0826				1.172		
	80		0.0860				1.184		
	90		0.0967				1.217		

参 考 文 献

[1] 陶宗晋,《离心沉降分析技术》,1983, 科学出版社。

[2] 程伊洪、王克勤,《仪器分析及其在分子生物学中的应用》,第三册, 138 页, 1978, 科学出版社。

[3] Schchman, H. K., "Ultracentrifugation, diffusion, and viscosity" in Methods in Enzymology, vol. 4, p. 32, 1957, Academic Press Inc., New York.

[4] Haschemeyer, R. H. & Haschemeyer, A. E. V., Proteins: A guide to study by physical and chemical methods, p. 160, 1973.

[5] Marmorosch, K. & Koprowski, H., Methods in Virology, pp. 3—86, 275, 1967, Academic Press Inc., New York.

[6] Osterman, A. L., Methods of protein and nucleic acid research, I. Electrophoresis, isoelectric focusing, ultracentrifugation, 1984, Springer-Verlag, Berlin, Heidelherg.

从蛋白质的一级结构预测二级结构

张　鹰
（中国科学院上海生物化学研究所）

蛋白质的一级结构决定高级结构，因此可以从一级结构推测高级结构。从这个思想基础出发，人们一直在致力于研究一级结构与高级结构的关系，建立高级结构的预测法。在二级结构的预测中，经验参数法是其主要的一支，在这里介绍的 Chou 与 Fasman 的经验参数法是其中使用得较广泛的，也是比较简便的，在对球蛋白的预测中，总准确率可达到 70—80%。

一、方　法

1. 构象参数

Chou 与 Fasman 对用 X 光晶体衍射法已知立体结构的 29 种蛋白质进行了统计处理，构建了 20 种氨基酸残基在 α-螺旋、β 折叠和 β 转角中的构象参数 P_α、P_β、P_t。其方法如下。

首先得到 20 种氨基酸残基在各构象单元的出现频率：

$$f_{j,k} = n_{j,k}/n_j$$

（其中 $n_{j,k}$ 为 j 残基在第 k 种构象单元出现的次数，n_j 为 j 残基的总出现次数）

再将 $f_{j,k}$ 除以 20 种残基在各构象单元的总平均出现频率：

$$\langle f_k \rangle = \sum_j f_{j,k}$$

即可得到构象参数：

$$P_\alpha = f_{j,\alpha}/\langle f_\alpha \rangle$$
$$P_\beta = f_{j,\beta}/\langle f_\beta \rangle$$
$$P_t = f_{j,t}/\langle f_t \rangle$$

在这些参数的基础上，Chou 与 Fasman 根据归纳的经验，将 20 种氨基酸残基对不同的构象单元划分成下列几种：

H：强形成者
h：形成者
I：弱形成者
i：中立者
b：破坏者
B：强破坏者

对于不同的构象，各残基的这种作用及其构象参数列于表 1 中。

表1　20种氨基酸残基在各构象中的参数 P_α, P_β, P_t. f_i, f_{i+1}, f_{i+2}, f_{i+3} 分别为20种残基在 β 转角中4个部位的出现几率

P_α		P_β		P_t	f_i	f_{i+1}	f_{i+2}	f_{i+3}
Glu 1.51		Val 1.70		Asn 1.56	Asn 0.161	Pro 0.301	Asn 0.191	Trp 0.167
Met 1.45		Ile 1.60	H_β	Gly 1.56	Cys 0.149	Ser 0.139	Gly 0.190	Gly 0.152
Ala 1.42	H_α	Tyr 1.47		Pro 1.52	Asp 0.147	Lys 0.115	Asp 0.179	Cys 0.128
Leu 1.21		Phe 1.38		Asp 1.46	His 0.140	Asp 0.110	Ser 0.125	Tyr 0.125
Lys 1.16		Trp 1.37		Ser 1.43	Ser 0.120	Thr 0.108	Cys 0.117	Ser 0.106
Phe 1.13		Leu 1.30		Cys 1.19	Pro 0.102	Arg 0.106	Tyr 0.114	Gln 0.098
Gln 1.11	h_α	Cys 1.19	h_β	Tyr 1.14	Gly 0.102	Gln 0.098	Arg 0.099	Lys 0.095
Trp 1.08		Thr 1.19		Lys 1.01	Thr 0.086	Gly 0.085	His 0.093	Asn 0.091
Ile 1.08		Gln 1.10		Gln 0.98	Tyr 0.082	Asn 0.083	Glu 0.077	Arg 0.085
Val 1.06		Met 1.05		Thr 0.96	Trp 0.077	Met 0.082	Lys 0.072	Asp 0.081
Asp 1.01	I_α	Arg 0.93		Trp 0.96	Gln 0.074	Ala 0.076	Thr 0.065	Thr 0.079
His 1.00		Asn 0.89	I_β	Arg 0.95	Arg 0.070	Tyr 0.065	Phe 0.065	Leu 0.070
Arg 0.98		His 0.87		His 0.95	Met 0.068	Glu 0.060	Trp 0.064	Pro 0.068
Thr 0.83	i_α	Ala 0.83		Glu 0.74	Val 0.062	Cys 0.053	Gln 0.037	Phe 0.065
Ser 0.77		Ser 0.75		Ala 0.66	Leu 0.061	Val 0.048	Leu 0.036	Glu 0.064
Cys 0.70		Gly 0.75	b_β	Met 0.60	Ala 0.060	His 0.047	Ala 0.035	Ala 0.058
Tyr 0.69	b_α	Lys 0.74		Phe 0.60	Phe 0.059	Phe 0.041	Pro 0.034	Ile 0.056
Asn 0.67		Pro 0.55		Leu 0.59	Glu 0.056	Ile 0.034	Val 0.028	Met 0.055
Pro 0.57	B_α	Asp 0.54	B_β	Val 0.50	Lys 0.055	Leu 0.025	Met 0.014	His 0.054
Gly 0.57		Glu 0.37		Ile 0.47	Ile 0.043	Trp 0.013	Ile 0.013	Val 0.053

于是 Chou 与 Fasman 方法可以同时作两种处理。一是利用残基的构象参数，可以计算任一蛋白质小片段中残基的 P_α、P_β、P_t 的平均值 $\langle P_\alpha \rangle$，$\langle P_\beta \rangle$，$\langle P_t \rangle$ 来求得该片段的构象潜能。片段的构象潜能越大，则形成该构象的可能性越大。其次是沿蛋白质或多肽的氨基酸序列把各残基分别归属为 α 螺旋和 β 折叠的形成者、中立者或破坏者，然后按下面的方法和规则搜寻和判断 α 螺旋和 β 折叠区。

2. α 螺旋的搜寻步骤

（1）螺旋的核心　肽链的6个连续残基中，如果有4个或4个以上的残基是螺旋的形成者或强形成者（h_α 或 H_α），同时螺旋的破坏者或强破坏者（b_α 或 B_α）的总数少于2个，则此肽段可以形成螺旋的核心。弱形成者（I_α）可作 $0.5h_\alpha$ 计人，因此假如6个连续残基中有3个 h_α 和2个 I_α 则可作为螺旋的核心。

（2）螺旋的延伸和终止　从螺旋核心向N末端和C末端两个方向延伸，直到出现四肽破坏者（即平均 $\langle P_\alpha \rangle$ 小于1.00的4个连续残基，一般为 b_4、b_3i、b_3h、b_2i_2、b_2ih、b_2h_2、bi_3、bi_2h、bih_2 和 i_4——b代表 b_α 和 B_α，i代表 i_α 和 I_α，h代表 h_α 和 H_α），螺旋乃终止。邻近出现 β 折叠时螺旋也终止。在此基础上重新分析被划入螺旋区的肽段，要求最终的螺旋区至少1/2的残基是螺旋的形成者，螺旋破坏者的残基数不得多于1/3。

（3）螺旋的边界　Pro、$Asp^{(-)}$、$Glu^{(-)}$ 常出现在螺旋的N末端区，$His^{(+)}$、$Lys^{(+)}$ $Arg^{(+)}$ 常出现在螺旋的C末端区。因此当 Pro 或 $Asp^{(-)}$ 在螺旋N末端区或 $Arg^{(+)}$ 在螺旋C末端区时可以作为 I_α 来考虑。

（4）Pro 是螺旋的强破坏者　Pro 不能出现在螺旋中央或螺旋的C末端，但可出现在螺旋N末端的前三个残基中。

〈规则一〉任何6个或6个以上的连续残基，如果满足以下几点：

1. $\langle P_\alpha \rangle \geq 1.03$，
2. $\langle P_\alpha \rangle > \langle P_\beta \rangle$，
3. 满足上列四种情况。

则可预测其构象为 α 螺旋。

3. β 折叠的搜寻步骤

（1）β 折叠的核心　肽链的5个连续残基中，如果有3个或3个以上的残基是 β 折叠的形成者或强形成者（h_β 或 H_β），且破坏者（b_β 或 B_β）的残基数少于两个，则此肽段可形成 β 折叠的核心。

（2）β 折叠的延伸和终止　从 β 折叠的核心向N末端和C末端两个方向延伸，直到出现一个四肽破坏者，β 折叠乃终止。四肽破坏者的条件参照螺旋的延伸，将其中相应的螺旋换成 β 折叠，α 换成 β。

（3）β 折叠的边界　带电荷的残基较少在 β 折叠中出现。Trp 经常出现在 β 折叠的N末端，但很少出现在C末端。

（4）强 β 折叠破坏者　$Glu^{(-)}$ 极少在 β 折叠中出现，Pro 不能出现在 β 折叠的中央。

〈规则二〉任何5个或5个以上的连续残基如果满足下列条件：

1. $\langle P_\beta \rangle \geq 1.05$，
2. $\langle P_\beta \rangle \geq \langle P_\alpha \rangle$，
3. 满足上列四种情况，

则可预测其构象为 β 折叠。

4. α 螺旋和 β 折叠的重叠区

当一段肽段中含有较多的既是 α 螺旋的形成者，又是 β 折叠形成者的残基（如 Met、Leu、Phe、Gln、Trp、Ile、Val）时，将使该区域的预测出现两可的情况，这时可以参照下列几点进行判断：

1. 计算重叠区的 $\langle P_\alpha \rangle$ 和 $\langle P_\beta \rangle$，如 $\langle P_\alpha \rangle > \langle P_\beta \rangle$，则判断其为 α 螺旋，如 $\langle P_\alpha \rangle < \langle P_\beta \rangle$ 则为 β 折叠。也可根据强形成者和强破坏者的多寡来判断。假如：一个六肽片段由 $(H_2h_2ib)_\alpha$ 和 $(Hh_3iB)_\beta$ 组成，由于螺旋的形成者较 β 折叠的强而破坏者较 β 折叠的弱，因此可判断此片段为 α 螺旋。

2. 可以根据边界参数（表略，参照 Biochemistry, 13:211）的预测结果进行判断。

3. 统计结果表明，α 螺旋一般包含的残基数较 β 折叠的要多，因此一段较长的片段如果 $\langle P_\alpha \rangle > \langle P_\beta \rangle$，则即使其中含一个小的片段，其 $\langle P_\beta \rangle > \langle P_\alpha \rangle$，也可判断为 α 螺旋。

```
10 SCREEN 2,1:KEY OFF
20 DEFINT N,K,J
30 DIM A$(26),B$(10),F(14,26)
40 REM                    read parameter
50 CLS
60 OPEN "DCHOU-F.DAT" FOR INPUT AS #1
70 FOR I=1 TO 26
80 INPUT#1,A$(I)
90 FOR J=0 TO 14:INPUT#1, F(J,I)
100 NEXT J,I
110 CLOSE
120 OPEN "SCRN:" FOR OUTPUT AS #3
130 GOTO 160
140 K=0:FILES"*.AA"
150 IF K>5 THEN 140
160 BEEP:PRINT:INPUT " Protein Name (Max 8-charactor)";N$:A$=LEFT$(N$,1):IF A$<"
A"OR A$>"z" THEN K=K+1:GOTO 150 ELSE IF LEN(N$)>8 THEN K=K+1:GOTO 150
170 PRINT N$:PRINT :KC=0
180 OPEN N$+".AA" AS #1 LEN=75
190 FIELD #1,75 AS S$
200 ALL=0:IF LOF(1)=0 THEN GOSUB 4180
210 OPEN N$+".dat" AS #2:K=LOF(2):CLOSE#2:IF K=0 THEN KC=1:KILL N$+".DAT"
220 GOSUB 400:GOSUB 3970
230 IF ALL<6 THEN PRINT "TOTOL";ALL;" Residues. TOO Short!":CLOSE#1:ERASE P,S$:K
=K+1:IF ALL=0 THEN KILL N$+".aa":GOTO 160 ELSE 160
240 IF KC>0 THEN GOSUB 560 ELSE GOSUB 2920
260 CLS:LOCATE 1,10:PRINT "<< Data Output Menu >>":LOCATE 3,3:PRINT N$,:IF NB>1
OR NE<ALL THEN PRINT "FRAGMENT",
270 PRINT NB;"-";NE
280 PRINT:PRINT TAB(10)"1.  output limit";TAB(10)"2.  check";TAB(10)"3.  figure"
;TAB(10)"4.  total result";TAB(10)"5.  data" TAB(10)"6.- parameter";TAB(10)"7.
hand predict";TAB(10)"8.  another protein"
290 PRINT TAB(10)"9.  print now ";:IF PRIN>.5 THEN PRINT " on" ELSE PRINT "off"
300 PRINT TAB(9)"10.  re-calculation";TAB(9)"99.  end":PRINT:INPUT "   Your choi
ce";NP
310 IF NP=1 THEN GOSUB 360 ELSE IF NP=4 THEN GOSUB 2160 ELSE IF NP=3 THEN GOSUB
1510 ELSE IF NP=2 THEN GOSUB 2500 ELSE IF NP=5 THEN GOSUB 2000 ELSE IF NP=6 THEN
 GOSUB 3160 ELSE IF NP=10 THEN GOSUB 1460:KC=1:GOTO 240
320 IF NP=8 THEN GOSUB 1460:CLOSE#1:GOTO 160 ELSE IF NP=7 THEN GOSUB 3740 ELSE I
F NP=99 THEN PRINT "end program":SYSTEM
330 IF NP=9 THEN BEEP:CLOSE#3:IF PRIN>.5 THEN PRIN=0:OPEN "SCRN:" FOR OUTPUT AS
#3:GOTO 260 ELSE PRIN=1:OPEN "LPT1:" FOR OUTPUT AS #3:GOTO 260
340 GOSUB 3930:GOTO 260
350 REM        sub get sequence
360 PRINT:PRINT "TOTOL";ALL;"RESIDUES":PRINT
370 INPUT "BEGIN NUMBER";NB:IF NB<1 OR NB>ALL THEN NB=1
380 INPUT "END NUMBER";NE:IF NE<NB OR NE>ALL THEN NE=ALL
390 RETURN
400 CLS:PRINT N$,:IF ALL>0 THEN PRINT "1 -";ALL ELSE PRINT
410 NE%=INT(LOF(1)/75)+1
420 DIM S$(NE%):PRINT
430 FOR I%=1 TO NE%
440 GET #1,I%
450 S$(I%-1)=S$:PRINT S$;
460 IF RIGHT$(S$,1)<"A" THEN 480
470 NEXT I%
480 PRINT:IF ALL>0 THEN 520
490 FOR KP=1 TO 75:IF MID$(S$,KP,1)<"A" THEN 510
500 NEXT KP
510 ALL=(I%-1)*75+KP-1:PRINT" Totol ";ALL:PRINT
520 N=ALL:NB=1:NE=ALL:DIM P(9,N)
530 RETURN
```

```
540 REM
550 REM                    calculation  block
560 N=ALL:DIM A(1,N),B(1,N),T(N-3):NUA=0:NUB=0:NUT=0:PRINT
570 PRINT "  Please wait a couple of minutes..........":PRINT
580 FOR J=1 TO N-3:PA=0:PB=0:PT=0:FT=1:FA=0:FB=0:BA=0:BB=0:FAN=1:FAC=1:FBN=1:FBC
=1:FA2=0:BA2=0:BB2=0
590 FOR K=0 TO 5 :KP=J+K:GOSUB 2430:IF D$<"A" THEN 760
600 S=ASC(D$)-64
610 PA=PA+F(0,S):PB=PB+F(1,S):IF K<4 THEN PT=PT+F(2,S):FT=FT*F(11+K,S)
620 IF K<3 THEN FAN=FAN*F(5,S):FAC=FAC*F(4,S):FBN=FBN*F(9,S):FBC=FBC*F(8,S) ELSE
 FAN=FAN*F(3,S):FAC=FAC*F(6,S):FBN=FBN*F(7,S):FBC=FBC*F(10,S)
630 IF F(0,S)>1.03 THEN FA=FA+1 ELSE IF F(0,S)>.9899999 THEN FA2=FA2+.5 ELSE IF
F(0,S)<.7 THEN BA=BA+1
640 IF D$="P" THEN BB2=5:IF K>2 THEN BA2=BA2+5 ELSE FA2=FA2+.5:BA2=BA2-1:IF K=0
THEN P(8,J)=3
650 IF D$="E" THEN BB2=5
660 IF K>2 AND (D$="R" OR D$="C") THEN FA2=FA2+.5
670 IF F(1,S)>1.03 THEN FB=FB+1 ELSE IF F(1,S)<.8 THEN BB=BB+1
680 IF K<>3 THEN 730
690 P(0,J)=PA/4:P(1,J)=PB/4
700 IF (PA<4 AND (BA>.9 OR FA<.9 OR FA+FA2<1.9))OR PA<3.6 THEN P(8,J)=1 ELSE IF
BA2>1 THEN IF P(8,J)=3 THEN P(8,J)=1 ELSE P(8,J)=2 ELSE P(8,J)=0
710 IF (PB<4 AND (BB>.5 OR FB<1.9))OR PB<3.6 THEN P(9,J)=1 ELSE P(9,J)=0
720 P(2,J)=PT/4:P(7,J)=FT:FTT=FTT+FT:IF PT>4 AND PT>PA AND PT>PB AND FT>7.500001
E-05 AND J>2 THEN NUT=NUT+1:T(NUT)=J
730 IF K=4 THEN IF PB>5 AND FB>2.9 AND BB<1.6 AND BB2<1 THEN NUB=NUB+1 :B(0,NUB)
=J :PRINT J;" B  ",:GOTO 750
740 IF K=5 THEN P(3,J+3)=FAN:P(4,J+2)=FAC:AN=AN+FAN:AC=AC+FAC:P(5,J+3)=FBN:P(6,J
+2)=FBC:BN=BN+FBN:BC=BC+FBC:IF PA>6 AND FA+FA2>3.9 AND BA+BA2<1.9 THEN NUA=NUA+1
 :A(0,NUA)=J:PRINT J;" A  ",
750 NEXT K
760 NEXT J
770 AN=AN/(N-5):AC=AC/(N-5):BN=BN/(N-5):BC=BC/(N-5):FTT=FTT/(N-3)
780 AV(3)=AN:AV(4)=AC:AV(5)=BN:AV(6)=BC:AV(7)=FTT
790 I=0:K=-1:EN=0
800 I=I+1:IF I>NUA THEN 830
810 IF A(0,I)>EN THEN EN=EN+2:K=K+1:A(0,K)=BEG:A(1,K)=EN:BEG=A(0,I)
820 EN=A(0,I)+3:GOTO 800
830 EN=EN+2:K=K+1:A(0,K)=BEG:A(1,K)=EN:NUA=K
840 I=0:K=-1:EN=0
850 I=I+1:IF I>NUB THEN 880
860 IF B(0,I)>EN THEN EN=EN+2:K=K+1:B(0,K)=BEG:B(1,K)=EN:BEG=B(0,I)
870 EN=B(0,I)+2:GOTO 850
880 EN=EN+2:K=K+1:B(0,K)=BEG:B(1,K)=EN:NUB=K
890 PRINT:IF NB=1 AND NE=ALL THEN GOSUB 2700
900 REM
910 REM                    check block
920 PRINT:GOSUB 4830
930 PRINT:PRINT "HELIX AT:":FOR NA=1 TO NUA:AB=A(0,NA)-1:AT=A(1,NA)-2
940 IF AB<1 THEN GOTO 1010
950 IF ABS(P(8,AB)-1.5)>.6 THEN AB=AB-1:GOTO 940:REM <>1,<>2
960 KM=AB:AB=AB+3:KN=3:AV=0
970 IF KN=0 THEN 1010
980 KP=KM+KN:GOSUB 2430:S=ASC(D$)-64:AV=AV+F(0,S)
990 IF F(0,S)<.7 AND D$<>"P" AND D$<>"T" THEN 1010 ELSE IF AV/(4-KN)>=1 THEN AB=
KM+KN-1
1000 KN=KN-1:GOTO 970
1010 IF AB>A(0,NA) THEN GOSUB 3300
1020 REM                   helix   C-term
1030 IF AT>N THEN 1090 ELSE M=ABS(P(8,AT)-2):ELSE IF M<.5 OR M>1.5 THEN AT=AT+1:
GOTO 1030    :REM <>1,<>3
1040 KM=AT:KN=1:AV=0
1050 IF KM=4 THEN 1090
```

```
1060 KP=KM+KN-1:GOSUB 2430:S=ASC(D$)-64:AV=AV+F(0,S)
1070 IF F(0,S)<.8 AND D$<>"R" AND D$<>"C" THEN 1090 ELSE IF AV/KN>=1 THEN AT=KM+
KN
1080 KN=KN+1:GOTO 1050
1090 IF AT<A(1,NA) THEN GOSUB 3330
1100 A(0,NA)=AB+1:A(1,NA)=AT-1
1110 PRINT NB+AB;"-";NB+AT-2,
1120 NEXT NA
1130 IF NUA=0 THEN PRINT" None"
1140 REM                sheet N-terminal
1150 PRINT:PRINT "SHEET AT:":FOR NB1=1 TO NUB:BB=B(0,NB1)-1:BT=B(1,NB1)-2
1160 IF BB<1 THEN BB=0:GOTO 1230
1170 IF P(9,BB)<.5 THEN BB=BB-1:GOTO 1160
1180 KM=BB:BB=BB+3:KN=3:AV=0
1190 IF KN=0 THEN 1230
1200 KP=KM+KN:GOSUB 2430:S=ASC(D$)-64:AV=AV+F(1,S)
1210 IF F(1,S)<.8 THEN 1230 ELSE IF AV/(4-KN)>=1 THEN BB=KM+KN-1
1220 KN=KN-1:GOTO 1190
1230 IF BB>B(0,NB1) THEN GOSUB 3360
1240 REM                 sheet C-term
1250 IF BT>N THEN 1320 ELSE IF P(9,BT)<.5 THEN BT=BT+1:GOTO 1250
1260 KM=BT:KN=1:AV=0
1270 IF KN=4 THEN 1310
1280 KP=KM+KN-1:GOSUB 2430:S=ASC(D$)-64:AV=AV+F(1,S)
1290 IF F(1,S)<.8 AND D$<>"N" THEN 1310 ELSE IF AV/KN>=1 THEN BT=KM+KN
1300 KN=KN+1:GOTO 1270
1310 IF BT<B(1,NB1) THEN GOSUB 3390
1320 B(0,NB1)=1+BB:B(1,NB1)=BT-1
1330 PRINT NB+BB;"-";NB+BT-2,
1340 NEXT NB1
1350 IF NUB=0 THEN PRINT" None"
1360 REM                turn
1370 PRINT:PRINT"TURN AT:" :NUT=NUT+1:T(NUT)=ALL:K1=0:K2=0
1380 FOR I=1 TO NUT-1
1390 K=T(I):IF K+1<T(I+1) THEN IF K2<1 THEN GOSUB 1430 ELSE K2=0 ELSE IF P(7,K)<
P(7,K+1) THEN K2=0 ELSE IF K2<1 THEN GOSUB 1430:K2=2
1400 NEXT I
1410 NUT=K1:IF K1<1 THEN PRINT" None"
1420 PRINT:RETURN
1430 K1=K1+1:T(K1)=K:PRINT K;"-"K+3,:RETURN
1440 REM
1450 REM                 back
1460 PRINT:FTT=0:AN=0:BN=0:AC=0:BC=0:NUA=0:NUB=0:NUT=0:Q$=""
1470 ERASE P,A,B,T,S$
1480 RETURN
1490 REM
1500 REM                 sub     picture
1510 CLS:PRINT:PRINT TAB(7)"The first line is the AA sequence";TAB(7)"The second
 line is <Pa>,<Pb>";TAB(7)"The third line is N-boundary data of Helix,Sheet";TAB
(7)"The forth line is C-boundary data of Helix,Sheet"
1520 PRINT:PRINT TAB(14)"(Solid line --------- Helix)";TAB(14)"(Dash line  - - -
 - - Sheet)":PRINT:PRINT TAB(7)"The fifth line is Pt=f(i)*f(i+1)*f(i+2)*f(i+3)":
PRINT:PRINT TAB(7)"After the figure, press (n/N) to quit, press other to next pi
cture":PRINT
1530 PRINT:INPUT" Residue per figure(70-80)";KL:IF KL<70 THEN KL=70 ELSE IF KL>8
0 THEN KL=80
1540 K=-KL:CLS
1550 A1=100:AN1=130:AC1=160
1560 B1=100:BN1=130:BC1=160
1570 T1=200:TT=200-INT(7.5)
1580 FOR J=NB TO NE
1590 KP=J:GOSUB 2430
1600 IF INT((J-NB)/KL)=(J-NB)/KL THEN GOSUB 1830
1610 PRINT D$;
1620 A=210-INT(P(0,J)*140)
```

```
1630 B=210-INT(P(1,J)*140)
1640 T=200-INT(P(7,J)*100000!)
1650 AN2=130-INT(P(3,J)/AN*3)
1660 AC2=160-INT(P(4,J)/AC*3)
1670 BN2=130-INT(P(5,J)/BN*3)
1680 BC2=160-INT(P(6,J)/BC*3)
1690 M=(J-NB-K)*8
1700 LINE(M,A1)-(M+8,A)
1710 LINE(M,AN1)-(M+8,AN2)
1720 LINE(M,AC1)-(M+8,AC2)
1730 Y1=B1:Y=B:GOSUB 1920
1740 Y1=BN1:Y=BN2:GOSUB 1920
1750 Y1=BC1:Y=BC2:GOSUB 1920
1760 LINE(M,T1)-(M+8,T)
1770 A1=A:B1=B:T1=T:AN1=AN2:AC1=AC2:BN1=BN2:BC1=BC2
1780 NEXT J
1790 LOCATE 2,1:PRINT N$;NB+K;"-";NE
1800 A$=INKEY$:IF A$="" THEN 1800
1810 RETURN 260
1820 REM            sub
1830 BEEP:IF K>-2 THEN LOCATE 2,1:PRINT N$;NB+K;"-";NB+K+KL-1 ELSE 1860
1840 A$=INKEY$:IF A$="" THEN 1840
1850 IF A$="n" OR A$="N"  THEN RETURN 1810
1860 K=K+KL:CLS:LINE(1,70)-(640,70):LINE(1,TT)-(640,TT)
1870 LINE(1,125.5)-(640,125.5)
1880 LINE(1,155.5)-(640,155.5)
1890 LOCATE 1,1:RETURN
1900 REM           turn
1910 REM            sub  dash line
1920 ST=SQR((Y-Y1)*(Y-Y1)+64)
1930 FOR I=0 TO ST-4 STEP 4
1940 LINE (M+8*I/ST,Y1+(Y-Y1)*I/ST)-(M+8*(I+1)/ST,Y1+(Y-Y1)*(I+1)/ST)
1950 NEXT I
1960 IF J/10=INT(J/10) THEN LINE(M+7,0)-(M+7,20)
1970 RETURN
1980 REM
1990 REM              sub   print  data
2000 PRINT#3, :PRINT#3, N$:PRINT#3,:PRINT#3, "    AA.  Pa    Pb    Pt     fan
 fac     fbn      fbc       ft"
2010 PRINT#3,
2020 FOR J=NB TO NE
2030 KP=J:GOSUB 2430:S=ASC(D$)-64
2040 PRINT#3, USING "###";J;:PRINT#3, " ";A$(S);" ";
2050 FOR I=0 TO 2 :PRINT#3, USING "#.##";P(I,J);
2060 PRINT#3, " ";:NEXT I
2070 FOR I=3 TO 7 :PRINT#3, USING "#.##^^^^";P(I,J);
2080 IF P(I,J)>AV(I)*1.5 THEN IF P(I,J)>2*AV(I) THEN PRINT#3, "* ": ELSE PRINT#3
, "? "; ELSE PRINT#3, "  ";
2090 NEXT I
2100 PRINT#3, USING "#";P(8,J);P(9,J);
2110 PRINT#3,:NEXT J
2120 PRINT#3,:PRINT#3, "1.5*AVERAGE","fan=";AN*1.5,"fac=";AC*1.5,"fbn=";BN*1.5,"
fbc=";BC*1.5,"ft=";FTT*1.5
2130 RETURN
2140 REM
2150 REM              sub print overlap
2160 NA=0:NB1=0:NT=0:NX=0:NY=0:NZ=0:NZT=0
2170 PRINT#3,:PRINT#3, N$,1;"-";ALL:PRINT#3,
2180 PRINT#3, STRING$(75,"_"):PRINT#3,
2190 FOR J1=1 TO ALL STEP 75
2200 NC=INT(J1/10)*10-J1
2210 IF NC>0  THEN NC1=NC+INT(J1):PRINT#3, TAB(NC);NC1;:IF NC1>ALL THEN 2230
2220 NC=NC+10 :IF NC<76 THEN 2210
2230 PRINT#3,:KP=J1:KL=75:GOSUB 2460:PRINT#3, Q$
2240 REM             helix
```

```
2250 IF NX>0 THEN NXA=NXA+1:IF NXA<76 THEN NX=NX-1:IF NXA>0 THEN PRINT#3, TAB(NX
A);"A"; :GOTO 2250 ELSE 2250 ELSE NXA=NXA-76:GOTO 2270
2260 NA=NA+1:IF NA>NUA THEN 2270 ELSE NXA=A(0,NA)-J1:NX=A(1,NA)-A(0,NA)+1:GOTO 2
250
2270 PRINT#3,
2280 REM          sheet
2290 IF NY>0 THEN NYB=NYB+1:IF NYB<76 THEN NY=NY-1:IF NYB>0 THEN PRINT#3, TAB(NY
B);"B"; :GOTO 2290 ELSE 2290 ELSE NYB=NYB-76:GOTO 2310
2300 NB1=NB1+1:IF NB1>NUB THEN 2310 ELSE NYB=B(0,NB1)-J1:NY=B(1,NB1)-B(0,NB1)+1:
GOTO 2290
2310 PRINT#3,
2320 REM          turn
2330 IF NZ>0 THEN NZT=NZT+1:IF NZT<76 THEN PRINT#3, TAB(NZT);"T"; :NZ=NZ-1:GOTO
2330  ELSE NZT=NZT-76:GOTO 2370
2340 NT=NT+1:IF NT>NUT THEN 2370
2350 DT=T(NT)-J1-NZT:IF DT<0 THEN NZ=4+DT ELSE NZT=T(NT)-J1:NZ=4
2360 GOTO 2330
2370 PRINT#3,
2380 PRINT#3, STRING$(75,"_"):PRINT#3,:NEXT J1
2390 GOSUB 2500
2400 RETURN
2410 REM
2420 REM          sub   1 character
2430 KP5=INT((KP-1)/75):KP6=KP-KP5*75:D$=MID$(S$(KP5),KP6,1)
2440 RETURN
2450 REM          sub   >1    sequ
2460 KP1=INT((KP-1)/75):KP2=KP-KP1*75:Q$=MID$(S$(KP1),KP2,KL)
2470 RETURN
2480 REM
2490 REM          sub print result
2500 NA=0:NB1=0:PRINT#3,:PRINT#3, N$
2510 PRINT#3,:PRINT#3, TAB(20)"Helix";TAB(48)"Pa";TAB(54)"Pb";TAB(58)"N-break";T
AB(67)"C-break"
2520 NA=NA+1:IF NA>NUA THEN 2560
2530 KP1=A(0,NA):KL1=A(1,NA)-A(0,NA):IF (KP1+KL1<NB OR KP1>NE)AND NP=2 THEN 2520

2540 ST=1:GOSUB 3430
2550 PRINT#3,:GOTO 2520
2560 PRINT#3,:PRINT#3,:PRINT#3, TAB(20)"Sheet";TAB(48)"Pa";TAB(54)"Pb";TAB(58)"N
-break";TAB(67)"C-break"
2570 NB1=NB1+1:IF NB1>NUB THEN 2610
2580 KP1=B(0,NB1):KL1=B(1,NB1)-B(0,NB1):IF (KP1+KL1<NB OR KP1>NE) AND NP=2 THEN
2570
2590 ST=2:GOSUB 3430
2600 PRINT#3,:GOTO 2570
2610 PRINT#3,:PRINT#3,:PRINT#3, TAB(15)"b-Turn";TAB(30)"Ft/0.75e-4";TAB(48)"Pa";
TAB(54)"Pb";TAB(60)"Pt"
2620 FOR I=1 TO NUT:KP=T(I)
2630 IF (KP+3<NB OR KP>NE) AND NP=2 THEN 2670
2640 PRINT#3, KP;" -";KP+3; :KP=KP-1
2650 PRINT#3, TAB(15)" ";:FOR J=0 TO 3:KP=KP+1:GOSUB 2430:PRINT#3, D$;:NEXT J
2660 KP=KP-3:PRINT#3, TAB(32)USING"##.##";P(7,KP)/7.500001E-05;:PRINT#3, TAB(45)
USING"###.##";P(0,KP);P(1,KP);P(2,KP)
2670 NEXT I
2680 RETURN
2690 REM  put data
2700 OPEN N$+".dat" AS #2 LEN=40 :K1=0
2710 FIELD#2,4 AS B$(0),4 AS B$(1),4 AS B$(2),4 AS B$(3),4 AS B$(4),4 AS B$(5),4
 AS B$(6),4 AS B$(7),4 AS B$(8),4 AS B$(9)
2720 A1$=MKI$(NUA):A2$=MKI$(NUB):LSET B$(0)=A1$+A2$:A1$=MKI$(NUT):A2$=MKI$(ALL):
LSET B$(1)=A1$+A2$:K=2
2730 FOR I=1 TO NUA:A1$=MKI$(A(0,I)):A2$=MKI$(A(1,I)):LSET B$(K)=A1$+A2$:K=K+1:I
F K=10 THEN K=0:K1=K1+1:PUT#2,K1
2740 NEXT I
2750 FOR I=1 TO NUB:A1$=MKI$(B(0,I)):A2$=MKI$(B(1,I)):LSET B$(K)=A1$+A2$:K=K+1:I
```

```
F K=10 THEN K=0:K1=K1+1:PUT#2,K1
2760 NEXT I
2770 FOR I=1 TO NUT :A1$=MKS$(T(I)):LSET B$(K)=A1$:K=K+1:IF K=10 THEN K=0:K1=K1+
1:PUT#2,K1
2780 NEXT I
2790 A1$=MKS$(AN):LSET B$(K)=A1$:K=K+1:IF K=10 THEN K=0:K1=K1+1:PUT#2,K1
2800 A1$=MKS$(AC):LSET B$(K)=A1$:K=K+1:IF K=10 THEN K=0:K1=K1+1:PUT#2,K1
2810 A1$=MKS$(BN):LSET B$(K)=A1$:K=K+1:IF K=10 THEN K=0:K1=K1+1:PUT#2,K1
2820 A1$=MKS$(BC):LSET B$(K)=A1$:K=K+1:IF K=10 THEN K=0:K1=K1+1:PUT#2,K1
2830 A1$=MKS$(FTT):LSET B$(K)=A1$:K=K+1:IF K=10 THEN K=0:K1=K1+1:PUT#2,K1
2840 IF K>0 THEN K1=K1+1:PUT#2,K1
2850 FOR I=1 TO ALL
2860 FOR J=0 TO 9
2870 A1$=MKS$(P(J,I)):LSET B$(J)=A1$
2880 NEXT J
2890 PUT#2,I+K1:NEXT I
2900 CLOSE#2:RETURN
2910 REM   sub get data
2920 OPEN N$+".dat" AS #2 LEN=40 :K1=1:K=2
2930 FIELD#2,4 AS B$(0),4 AS B$(1),4 AS B$(2),4 AS B$(3),4 AS B$(4),4 AS B$(5),4
 AS B$(6),4 AS B$(7),4 AS B$(8),4 AS B$(9)
2940 GET#2,1:NUA=CVI(LEFT$(B$(0),2)):NUB=CVI(RIGHT$(B$(0),2)):NUT=CVI(LEFT$(B$(1
),2)):AL=CVI(RIGHT$(B$(1),2)):IF AL<>ALL THEN KC=1:CLOSE#2:RETURN 230
2950 DIM A(1,NUA),B(1,NUB),T(NUT+1)
2960 FOR I=1 TO NUA:A(0,I)=CVI(LEFT$(B$(K),2)):A(1,I)=CVI(RIGHT$(B$(K),2)):K=K+1
:IF K>9 THEN K1=K1+1:GET#2,K1:K=0
2970 NEXT I
2980 FOR I=1 TO NUB:B(0,I)=CVI(LEFT$(B$(K),2)):B(1,I)=CVI(RIGHT$(B$(K),2)):K=K+1
:IF K>9 THEN K1=K1+1:GET#2,K1:K=0
2990 NEXT I
3000 FOR I=1 TO NUT:T(I)=CVS(B$(K)):K=K+1:IF K>9 THEN K1=K1+1:GET#2,K1:K=0
3010 NEXT I
3020 AN=CVS(B$(K)):K=K+1:IF K>9 THEN K1=K1+1:GET#2,K1:K=0
3030 AC=CVS(B$(K)):K=K+1:IF K>9 THEN K1=K1+1:GET#2,K1:K=0
3040 BN=CVS(B$(K)):K=K+1:IF K>9 THEN K1=K1+1:GET#2,K1:K=0
3050 BC=CVS(B$(K)):K=K+1:IF K>9 THEN K1=K1+1:GET#2,K1:K=0
3060 FTT=CVS(B$(K)):K=K+1
3070 AV(3)=AN:AV(4)=AC:AV(5)=BN:AV(6)=BC:AV(7)=FTT
3080 FOR I=1 TO ALL
3090 GET#2,K1+I
3100 FOR J=0 TO 9:P(J,I)=CVS(B$(J))
3110 NEXT J,I
3120 CLOSE#2
3130 IF NP<>1 THEN GOSUB 920
3140 RETURN
3150 REM          sub parameter
3160 PRINT#3,:PRINT#3, N$:FOR I=NB TO NE STEP 10
3170 PRINT#3,:PRINT#3, I;"-";:IF I+9>NE THEN PRINT#3, NE; ELSE PRINT#3, I+9;
3180 PRINT#3, TAB(14)" ";
3190 FOR J=0 TO 9:KP=I+J:IF KP>NE THEN 3210 ELSE GOSUB 2430:W=ASC(D$)-64
3200 PRINT#3, A$(W);" -";:NEXT J
3210 PRINT#3,:PRINT#3, TAB(4);"Pa";TAB(14)" ";
3220 FOR J=0 TO 9:KP=I+J:IF KP>NE THEN 3240 ELSE GOSUB 2430:W=ASC(D$)-64
3230 PRINT#3, USING "#.## ";F(0,W);:NEXT J
3240 PRINT#3,:PRINT#3, TAB(4);"Pb";TAB(14)" ";
3250 FOR J=0 TO 9:KP=I+J:IF KP>NE THEN 3280 ELSE GOSUB 2430:W=ASC(D$)-64
3260 PRINT#3, USING "#.## ";F(1,W);:NEXT J
3270 NEXT I
3280 RETURN
3290 REM          sub average
3300 AB=A(0,NA)-1:KP=AB+1:GOSUB 2430:W=ASC(D$)-64
3310 IF F(0,W)<.7 THEN AB=AB+1 ELSE IF F(0,W)>1 THEN 3320 ELSE KP=KP+1:GOSUB 243
0:W=ASC(D$)-64:IF F(0,W)<.7 THEN AB=AB+2
3320 RETURN
```

```
3330 AT=A(1,NA)+1:KP=AT-1:GOSUB 2430:W=ASC(D$)-64
3340 IF F(0,W)<.7 THEN AT=AT-1 ELSE IF F(0,W)>1 THEN 3350 ELSE KP=KP-1:GOSUB 243
0:W=ASC(D$)-64:IF F(0,W)<.7 THEN AT=AT-2
3350 RETURN
3360 BB=B(0,NB1)-1:KP=BB+1:GOSUB 2430:W=ASC(D$)-64
3370 IF F(1,W)<.8 THEN BB=BB+1 ELSE IF F(1,W)>1 THEN 3380 ELSE KP=KP+1:GOSUB 243
0:W=ASC(D$)-64:IF F(0,W)<.8 THEN BB=BB+2
3380 RETURN
3390 BT=B(1,NB1)+1:KP=BT-1:GOSUB 2430:W=ASC(D$)-64
3400 IF F(1,W)<.8 THEN BT=BT-1 ELSE IF F(1,W)>1 THEN 3410 ELSE KP=KP-1:GOSUB 243
0:W=ASC(D$)-64:IF F(1,W)<.8 THEN BT=BT-2
3410 RETURN
3420 PRINT#3, KP1;" -";KP1+KL1+1;
3430 AV=0:AV1=0:PRINT#3, KP1;" -";KP1+KL1;TAB(15)" ";
3440 FOR I=0 TO KL1:KP=KP1+I:GOSUB 2430:W=ASC(D$)-64
3450 ON ST GOSUB 3890,3910
3460 IF ST=1 THEN IF (D$="P" AND I<2.5) OR (D$="R" AND I>KL1-1.5) THEN F$="I"
3470 PRINT#3, F$;:AV=AV+F(0,W):AV1=AV1+F(1,W)
3480 NEXT I
3490 AV=AV/(KL1+1):AV1=AV1/(KL1+1)
3500 PRINT#3, TAB(45) USING"###.##";AV;AV1;:PRINT#3, TAB(59)" ";
3510 REM      N-term
3520 IF KP1<5 THEN KN=5-KP1 ELSE KN=0
3530 FOR I=1 TO KN:PRINT#3, "*";:NEXT I
3540 FOR I=KN TO 3:KP=KP1+I-4:GOSUB 2430:W=ASC(D$)-64
3550 ON ST GOSUB 3890,3910:PRINT#3, F$;:NEXT I
3560 REM      C-term
3570 KN=KP1+KL1+4-ALL:IF KN<0 THEN KN=0
3580 PRINT#3, TAB(68)" ";
3590 FOR I=1 TO 4-KN:KP=KP1+KL1+I:GOSUB 2430:W=ASC(D$)-64
3600 ON ST GOSUB 3890,3910:PRINT#3, F$;:NEXT I
3610 FOR I=1 TO KN:PRINT#3, "*";:NEXT I
3620 RETURN
3630 REM     sub hand predict
3640 REM           sub sequ
3650 PRINT#3,:PRINT#3,N$:IF A$="S" OR A$="s" THEN ST=30 ELSE ST=15
3660 FOR I=NB TO NE STEP ST
3670 PRINT#3,:PRINT#3, USING"###";I;:PRINT#3, "-";:K=I+ST-1:IF K>NE THEN K=NE
3680 PRINT#3, USING"###";K;:PRINT#3, TAB(10)" ";
3690 FOR J=0 TO ST-1:KP=I+J:IF KP>NE THEN 3730 ELSE GOSUB 2430
3700 IF A$="S" OR A$="s" THEN PRINT#3, D$;ELSE W=ASC(D$)-64:PRINT#3, A$(W);
3710 IF KP/10=INT(KP/10) THEN PRINT#3, "/"; ELSE PRINT#3,"-";
3720 NEXT J,I
3730 PRINT#3,:RETURN
3740 PRINT#3,:PRINT#3,N$:ST=30
3750 FOR I=NB TO NE STEP ST
3760 PRINT#3,:PRINT#3, USING"###";I;:PRINT#3, "-";:K=I+ST-1:IF K>NE THEN K=NE
3770 PRINT#3, USING"###";K;:PRINT#3, TAB(10)" ";
3780 FOR J=0 TO ST-1:KP=I+J:IF KP>NE THEN 3810 ELSE GOSUB 2430
3790 PRINT#3, D$;:IF KP/10=INT(KP/10) THEN PRINT#3, "/"; ELSE PRINT#3,"-";
3800 NEXT J
3810 PRINT#3,:PRINT#3, TAB(4);"Pa";
3820 FOR J=0 TO ST-1:KP=I+J:IF KP>NE THEN 3840 ELSE GOSUB 2430:W=ASC(D$)-64
3830 GOSUB 3890:PRINT#3, TAB(11+J*2) F$;:NEXT J
3840 PRINT#3,:PRINT#3, TAB(4);"Pb";
3850 FOR J=0 TO ST-1:KP=I+J:IF KP>NE THEN 3880 ELSE GOSUB 2430:W=ASC(D$)-64
3860 GOSUB 3910:PRINT#3, TAB(11+J*2) F$;:NEXT J
3870 NEXT I
3880 PRINT#3,:RETURN
3890 Z=F(0,W):IF Z>1.2 THEN F$="H" ELSE IF Z>1.03 THEN F$="h" ELSE IF Z>.9899999
 THEN F$="I" ELSE IF Z>.6950001 THEN F$="i" ELSE IF Z>.6 THEN F$="b" ELSE IF Z>.
5 THEN F$="B" ELSE PRINT#3, "WRONG" :END
3900 RETURN
3910 Z=F(1,W):IF Z>1.4 THEN F$="H" ELSE IF Z>1.03 THEN F$="h" ELSE IF Z>.8 THEN
F$="i" ELSE IF Z>.6 THEN F$="b" ELSE IF Z>.3 THEN F$="B" ELSE PRINT#3, "WRONG"
```

```
3920 RETURN
3930 LOCATE 25,1:BEEP:PRINT"Please press any key";
3940 A$=INKEY$:IF A$="" THEN 3940
3950 CLS:RETURN
3960 REM          sub  open  manu
3970 CLS:LOCATE 1,10:PRINT "<< Sequence  Menu >>":LOCATE 3,3:PRINT N$,:IF NB>1 O
R NE<ALL THEN PRINT "fragment",
3980 PRINT NB;"-";NE
3990 PRINT:PRINT TAB(10)"0.  calculation";TAB(10)"1.  analogue";TAB(10)"2.  sequ
ence continue";TAB(10)"3.  change residue";TAB(10)"4.  insert residue";TAB(10)"5
.  delete residue";TAB(10)"6.  print sequence";TAB(10)"7.  hand prediction";
4000 PRINT TAB(10)"8.  change to another protein";TAB(10)"9.  print now ";:IF PR
IN>.5 THEN PRINT "on" ELSE PRINT "off"
4010 PRINT TAB(9)"10.  re-calculation";TAB(9)"99.  end":PRINT:INPUT "   Your cho
ice";NP
4020 IF NP=3 THEN GOSUB 4080 ELSE IF NP=10 THEN KC=1:GOTO 4070 ELSE IF  NP=8 THE
N ERASE P,S$:CLOSE#1:GOTO 160 ELSE IF NP=99 THEN PRINT "   END":SYSTEM
4022 IF NP=7 THEN GOSUB 3740:IF PRIN<.5 THEN GOSUB 3930
4030 IF NP=6 THEN PRINT:INPUT" Single or Three-charactor Lable of AA.(S/T)";A$:I
F A$="S" OR A$="s" OR A$="T" OR A$="t" THEN GOSUB 3650 ELSE BEEP:GOTO 4030
4040 IF NP=9 THEN BEEP:CLOSE#3:IF PRIN>.5 THEN PRIN=0:OPEN "SCRN:" FOR OUTPUT AS
 #3 ELSE PRIN=1:OPEN "LPT1:" FOR OUTPUT AS #3
4050 IF NP=0 THEN 4070 ELSE IF NP=2 THEN GOSUB 4190:GOSUB 400 ELSE IF NP=4 THEN
GOSUB 4350 ELSE IF NP=5 THEN GOSUB 4510 ELSE IF NP=1 THEN GOSUB 4710
4060 GOTO 3970
4070 NB=1:NE=ALL:RETURN
4080 CLS:PRINT "Change  ",N$,:GOSUB 4630
4090 PRINT:INPUT"  Numbe. change";NUMB
4100 IF NUMB<NB OR NUMB>NE THEN 4160
4110 KP=NUMB:GOSUB 2430:W=ASC(D$)-64:PRINT KP;"  Old residue: ";D$;"  ";A$(W)
4120 INPUT"  New residue";A$:IF A$="" THEN 4160 ELSE IF A$<"A" OR A$>"Z" THEN BE
EP:GOTO 4110
4130 A$=LEFT$(A$,1):IF A$<>D$ THEN W=ASC(A$)-64:PRINT" Change to ";A$;"  ";A$(W):
 ELSE 4090
4140 MID$(S$(KP5),KP6)=A$:KC=KC+1:LSET S$=S$(KP5):PUT#1,KP5+1
4150 GOTO 4090
4160 RETURN
4170 REM      sub new sequence
4180 CLS:PRINT N$,"  New":PRINT
4190 KP1=0 :KP2=0
4200 IF ALL>0 THEN KP1=INT(ALL/75):KP2=ALL-KP1*75:Q$=LEFT$(S$(KP1),KP2):CLS:PRIN
T N$,"1 -";ALL,"  Sequence":GOSUB 4630:PRINT:ERASE P,S$
4210 N=0
4220 PRINT " Please use capital single lable of amino acid(AA),(Esc) to end."
4230 GOSUB 4290
4240 IF A$=CHR$(27) THEN 4260 ELSE N=N+1:KP2=KP2+1:Q$=Q$+A$:IF KP2=75 THEN LSET
S$=Q$:KP1=KP1+1:KP2=0:PUT#1,KP1:Q$=""
4250 GOTO 4230
4260 IF N>0 THEN KC=1:ALL=ALL+N:KP1=KP1+1:LSET S$=Q$: PUT#1,KP1
4270 RETURN
4280 REM      sub get AA.
4290 PRINT "  No.";KP1*75+KP2+1;" AA. ?";
4300 A$=INKEY$: IF A$="" THEN 4300
4310 PRINT A$
4320 IF A$<"A" OR A$>"Y" THEN IF A$=CHR$(27) THEN 4330 ELSE GOSUB 4340 ELSE IF A
$="B" OR A$="J" OR A$="O" OR A$="U" OR A$="X" THEN GOSUB 4340
4330 RETURN
4340 BEEP:PRINT " Please use capital single lable of amino acid(AA),(Esc) to end
.":RETURN 4290
4350 CLS:PRINT"  Insert",N$:GOSUB 4630:PRINT:INPUT " Begin number";KP:IF KP<NB O
R KP>NE THEN 4480
4360 KP1=INT((KP-1)/75):KP2=KP-KP1*75-1:N=0:I$=""
4370 PRINT " Please use capital single lable of amino acid(AA),(Esc) to end."
4380 GOSUB 4290
```

```
4390 IF A$=CHR$(27) THEN 4410 ELSE N=N+1:I$=I$+A$:KP2=KP2+1:IF N=225 THEN 4410
4400 GOTO 4380
4410 IF N<1 THEN 4480 ELSE KC=1:ALL=ALL+N:KP5=KP1:KP2=KP-KP1*75
4420 Q$=LEFT$(S$(KP5),KP2-1)+I$:N=N-(76-KP2):IF N<0 THEN GOSUB 4490
4430 KP1=KP1+1:LSET S$=Q$:PUT#1,KP1:Q$=RIGHT$(I$,N):N=N-75:IF N<0 THEN GOSUB 449
0 ELSE 4430
4440 Q$=RIGHT$(Q$,N):KP5=KP5+1:Q$=Q$+S$(KP5)
4450 KP1=KP1+1:LSET S$=Q$:PUT#1,KP1
4460 IF KP1*75<ALL GOTO 4440
4470 ERASE P,S$:GOSUB 400
4480 RETURN
4490 Q$=Q$+RIGHT$(S$(KP5),76-KP2):N=N+76-KP2:IF N<0 THEN KP5=KP5+1:Q$=Q$+S$(KP5)
:N=75-N
4500 RETURN 4450
4510 CLS:PRINT"  Delete",N$:GOSUB 4630:PRINT:INPUT " Begin number";KP:IF KP<NB O
R KP>NE THEN 4600
4520 INPUT " How many residues to be deleted";N:IF N<=0 OR NB+N-1>NE THEN 4600
4530 KP1=INT((KP-1)/75):KP2=KP-KP1*75:KP5=KP1
4540 Q$=LEFT$(S$(KP5),KP2-1):N=76-KP2-N
4550 IF N<0 THEN KP5=KP5+1:N=N+75:GOTO 4550 ELSE GOSUB 4610
4560 Q$=RIGHT$(Q$,N):KP5=KP5+1:Q$=Q$+S$(KP5)
4570 KP1=KP1+1:LSET S$=Q$:PUT#1,KP1
4580 IF KP1*75<ALL GOTO 4560
4590 KC=1:ALL=0:ERASE P,S$:GOSUB 400
4600 RETURN
4610 Q$=Q$+RIGHT$(S$(KP5),N):N=N-76+KP2:IF N<0 THEN KP5=KP5+1:Q$=Q$+S$(KP5):N=75
+N
4620 RETURN 4570
4630 PRINT:ST=30
4640 FOR I=NB TO NE STEP ST
4650 PRINT:PRINT USING"###";I;:PRINT "-";:K=I+ST-1:IF K>NE THEN K=NE
4660 PRINT USING"###";K;:PRINT TAB(10)" ";
4670 FOR J=0 TO ST-1:KP=I+J:IF KP>NE THEN 4700 ELSE GOSUB 2430
4680 PRINT D$;:IF KP/10=INT(KP/10) THEN PRINT "/"; ELSE PRINT"-";
4690 NEXT J ,I
4700 PRINT:RETURN
4710 PRINT:PRINT" Please input analogue name. Then use other function to change
residue.":PRINT
4720 INPUT" Analogue Name(Return to exit)";N2$:IF N2$="" THEN 4820 ELSE A$=LEFT$
(N2$,1):IF A$<"A" OR A$>"z" THEN 4720
4730 CLOSE #1
4740 OPEN N2$+".AA" AS #1 LEN=75
4750 IF LOF(1)>0 THEN BEEP:INPUT" Analogue already exist. Over-print it (Y/N)";A
$ ELSE 4790
4760 IF A$="y" OR A$="Y" THEN 4790
4770 IF A$="N" OR A$="n" THEN CLOSE#1:OPEN N$+".aa" AS #1 LEN=75:FIELD#1,75 AS S
$:GOTO 4820
4780 GOTO 4750
4790 N$=N2$:KC=1:FIELD#1,75 AS S$
4800 FOR I%=1 TO INT((ALL-1)/75)+1
4810 LSET S$=S$(I%-1):PUT #1,I% :NEXT I%
4820 RETURN
4830 PRINT#3,"Helix Nuclear ";:IF NUA>0 THEN PRINT#3,"At:" ELSE PRINT#3,"None":G
OTO 4860
4840 FOR I=1 TO NUA:PRINT#3, A(0,I);" -";A(1,I),:NEXT I
4850 PRINT#3,
4860 PRINT#3,"Sheet Nuclear ";:IF NUB>0 THEN PRINT#3,"At:" ELSE PRINT#3,"None":G
OTO 4890
4870 FOR I=1 TO NUB:PRINT#3, B(0,I);" -";B(1,I),:NEXT I
4880 PRINT#3,
4890 PRINT#3," Turn ";:IF NUT>0 THEN PRINT#3,"At:" ELSE PRINT#3,"None":GOTO 4910

4900 FOR I=1 TO NUT:PRINT#3, T(I);" -";T(I)+3,:NEXT I
4910 PRINT#3,:RETURN
```

4. 当两个重叠区与一个已预测的 β 转角相邻时，可以预测为 β 折叠。一般利于形成反平行的 β 折叠。

5. β 转角的预测

Chou 与 Fasman 统计了 20 种氨基酸残基在 β 转角中四个不同位置上的出现频率 f_i、f_{i+1}、f_{i+2}、f_{i+3}，如表 1 所示。通过计算 β 转角的发生几率 $Pt = f_i \times f_{i+1} \times f_{i+2} \times f_{i+3}$ 和平均 β 转角潜能 $\langle Pt \rangle$，可以按下列规则预测 β 转角。

〈规则三〉任何 1 个四肽片段，如果满足下列条件，

1. $Pt > 0.75 \times 10^{-4}$，
2. $\langle P_t \rangle > 1.00$，
3. $\langle P_\alpha \rangle < \langle P_t \rangle > \langle P_\beta \rangle$，

则可预测其构象为 β 转角。

6. 一个预测蛋白质二级结构的计算机程序

Chou 与 Fasman 的方法包含了重复的加和求平均值的运算和一些简单的逻辑判断，把这些工作交给计算机将使该方法的应用更为方便。这种程序很多。作者根据国内现有情况，选用了人机对话功能较强的 IBM 磁盘 BASIC 语言，编成一个实用程序。

程序主要由氨基酸序列的输入与编辑，参数的运算与二级结构预测，结果的输出等三个部分组成。人机对话均有提示，应答如有错误，计算机将重新提问。程序中有作图指令，因此如果需要图表时要配置图形显示系统。

以下以胰脏胰蛋白酶抑制剂的二级结构预测为例来说明程序的使用方法。

在 DOS 状态打入 BASICA␣（空格）Chou-FAS↵（回车符）后，程序即开始运行。首先屏幕上显示要求输入蛋白质名称或记号，名称要以字母开头，最长不超过 8 个字符。在本例中键入 Try-Inh↵，程序就进入第一个氨基酸序列编辑子程序。因为 Try-Inh 是一个新的蛋白质，计算机将直接要求用户读入氨基酸序列。氨基酸残基是以大写的单字符形式输入，不需打回车。如果格式有错误，计算机将鸣声报警，并显示符号提醒用户重新打入。在此连续地键入 RPDF……。58 个残基全部输入后按〈ESC〉键退出。在序列输入中如有多打，漏打，错打等，可跳过错误按序号继续输入，错误留给氨基酸序列编辑子程序去处理。序列编辑的菜单如图 2(A)所示。它的功能有下列几种可供选择。

0. 计算功能：结束编辑，进入下一步计算；
10. 重计算功能：结束编辑，进入下一步并重新计算；
1. 设定同系物功能：读入同系物名，给同系物一个相同序列的拷贝并转向对同系物的序列编辑；
2. 序列的延续：接在 C 末端后继续输入氨基酸序列；
3. 修改残基：打入相应的残基序号，输入新残基；
4. 插入序列：打入需插入的位置，输入插入序列；
5. 删除序列：打入需删除的序列的起始位置和删除的残基个数，去除该段序列；
6. 显示序列：可选择单字符和三字符两种形式；
7. 手工预测表列：按序列将残基归属为 α 螺旋和 β 折叠的形成者，中立者和破坏者

```
«Sequence Menu»
Try-Inh          1—58
          0. calculation
          1. analogue
          2. sequence continue
          3. change residue
          4. insert residue
          5. delete residue
          6. print sequence
          7. hand prediction
          8. change to another protein
          9. print now off
         10. re-calculation
         99. end
Your choice?
```

图 2 (A) 氨基酸序列编辑菜单

```
«Data Output Menu»
Try-Inh      1—58
          1. output Limit
          2. check
          3. figure
          4. total result
          5. data
          6. parameter
          7. hand predict
          8. another protein
          9. print now on
         10. re-calculation
         99. end
Your choice?
```

图 2 (B) 数据输出菜单

等;

9. 打印选择开关: 决定 6 和 7 的显示内容是否打印;

8. 另一个蛋白质: 结束编辑,存贮序列,重头开始;

99. 结束: 运行结束,存贮序列后回到 DOS 状态。

用户可以打入相对应的数字选择这些功能。现在我们打入数字 0↵, 进入下一步的计算。

在计算前,如果序列以前已计算过, 又没有修改, 在进入计算时选择的是计算功能而不是重计算,则计算机只需调用以前已存贮的数据即可。现在这是一个新的蛋白质,程序开始参数运算。首先计算沿着氨基酸序列逐格移动的"四肽窗口"的 $\langle P_\alpha \rangle$、$\langle P_\beta \rangle$、$\langle P_t \rangle$、Pt 值, 预测 β 转角的位置并判断此四肽是否 α 或 β 的破坏者。同时也寻找 α 螺旋的六肽核心和 β 折叠的五肽核心,找到核心后在屏幕上显示开头位置和对应的 (A) 或 (B)。 接着计算边界数据,进行核心合并,特殊氨基酸特例分析,核心的延伸和终止判断,边界残基的取舍等操作,由此得到的 α 螺旋和 β 折叠相互独立的预测结果存入磁盘,进入下面的数据

```
Try-Inh          1 - 58
------------------------------------------------------------------------------------
         10        20        30        40        50        60
RPDFCLEPPYTGPCKARIIRYFTNAKAGLCQTFVYGGCRAKRNNFKSAEDCMRTCGGA
  AAAAA      AAAAAAA AAAAAAAAAAAAA          AAAAAAAAA
                 BBBBBBB    BBBBBBB                BBBBB
       TTTTTTTT                     TTTT  TTTTTT      TTTT
------------------------------------------------------------------------------------
```

Try-Inh

	Helix	Pa	Pb	N-break	C-break
3 - 7	IhiHH	1.11	0.96	**iB	BBbi
14 - 20	ihHihhI	1.06	1.12	biBB	bhib
22 - 34	hibHhHBHihihh	1.02	1.11	hhib	bBBI
45 - 53	hhiHHIiHI	1.13	0.86	hibb	iiBB

	Sheet	Pa	Pb	N-break	C-break
18 - 24	HHiHhhi	0.92	1.29	hbii	ibib
29 - 35	hhhhhHH	0.96	1.33	ibib	bbhi
51 - 55	hhihh	0.93	1.11	biBB	bbi*

	b-Turn	Ft/0.75e-4	Pa	Pb	Pt
8 - 11	PPYT	3.69	0.66	0.94	1.29
10 - 13	YTGP	1.53	0.66	0.99	1.30
12 - 15	GPCK	4.55	0.75	0.81	1.32
35 - 38	YGGC	2.26	0.63	1.04	1.36
41 - 44	KRNN	1.35	0.87	0.86	1.27
43 - 46	NNFK	1.10	0.91	0.97	1.18
54 - 57	TCGG	2.09	0.67	0.97	1.32

图 3(A) 显示的结果

上图 A、B、T 分别与α螺旋，β 折叠和β转角相对应；
下图显示片段的形成者分布，构象潜能值和片段外 N、C 两个末端的四肽破坏者组成。

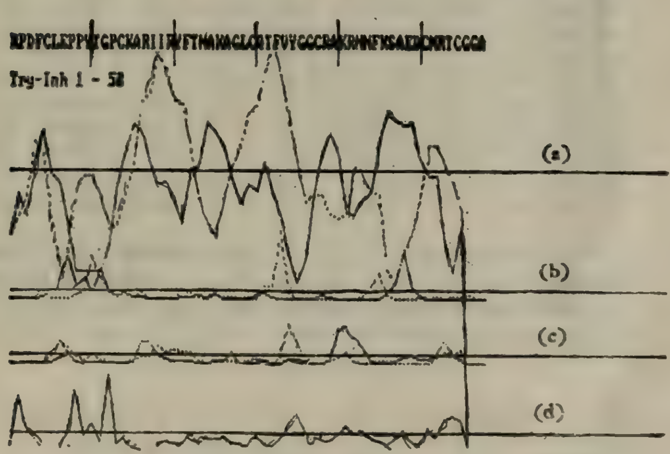


图 3(B) 图形显示

(a) 为四个连续残基的平均 $\langle P_\alpha \rangle$，$\langle P_\beta \rangle$；(b) 为α和β的N端边界参数；(c) 为α和β的C端边界参数。(a)、(b)、(c) 中实线表示α螺旋，虚线表示β折叠，水平直线的 $\langle P \rangle = 1.00$；(d) 为β转角几率，直线的 $P_t = 1.0 \times 10^{-4}$。

```
Try-Inh

1 - 10      Arg -Pro -Asp -Phe -Cys -Leu -Glu -Pro -Pro -Tyr -
  Pa        0.98 0.57 1.01 1.13 0.70 1.21 1.51 0.57 0.57 0.69
  Pb        0.93 0.55 0.54 1.38 1.19 1.30 0.37 0.55 0.55 1.47
11 - 20     Thr -Gly -Pro -Cys -Lys -Ala -Arg -Ile -Ile -Arg -
  Pa        0.83 0.57 0.57 0.70 1.16 1.42 0.98 1.08 1.08 0.98
  Pb        1.19 0.75 0.55 1.19 0.74 0.83 0.93 1.60 1.60 0.93
21 - 30     Tyr -Phe -Thr -Asn -Ala -Lys -Ala -Gly -Leu -Cys -
  Pa        0.69 1.13 0.83 0.67 1.42 1.16 1.42 0.57 1.21 0.70
  Pb        1.47 1.38 1.19 0.89 0.83 0.74 0.83 0.75 1.30 1.19
31 - 40     Gln -Thr -Phe -Val -Tyr -Gly -Gly -Cys -Arg -Ala -
  Pa        1.11 0.83 1.13 1.06 0.69 0.57 0.57 0.70 0.98 1.42
  Pb        1.10 1.19 1.38 1.70 1.47 0.75 0.75 1.19 0.93 0.83
41 - 50     Lys -Arg -Asn -Asn -Phe -Lys -Ser -Ala -Glu -Asp -
  Pa        1.16 0.98 0.67 0.67 1.13 1.16 0.77 1.42 1.51 1.01
  Pb        0.74 0.93 0.89 0.89 1.38 0.74 0.75 0.83 0.37 0.54
51 - 58     Cys -Met -Arg -Thr -Cys -Gly -Gly -Ala -
  Pa        0.70 1.45 0.98 0.83 0.70 0.57 0.57 1.42
  Pb        1.19 1.05 0.93 1.19 1.19 0.75 0.75 0.83
```

图 3(C) 参数表列

```
Try-Inh

1- 30    R-P-D-F-C-L-E-P-P-Y/T-G-P-C-K-A-R-I-I-R/Y-F-T-N-A-K-A-G-L-C/
 Pa      i B I h i H H B B b i B B i h H i h h i b h i b H h H B H i
 Pb      i B B h h h B B B H h b B h b i i H H i H h h i i b i b h h
31- 58   Q-T-F-V-Y-G-G-C-R-A/K-R-N-N-F-K-S-A-E-D/C-M-R-T-C-G-G-A-
 Pa      h i h h b B B i i H h i b b h h i H H I i H i i i B B H
 Pb      h h h H H b b h i i b i i i h b b i B B h h i h h b b i
```

图 3(D) 手工预测表列

Try-Inh

	AA.	Pa	Pb	Pt	fan	fac	fbn	fbc	ft	
44	Asn	0.93	0.94	1.15	0.81	0.98	1.17	1.01	0.50E-04	11
45	Phe	1.12	0.92	0.93	0.86	0.87	1.29*	1.16*	0.49E-04	01
46	Lys	1.21	0.67	0.96	1.08	0.93	1.09	1.09	0.17E-04	01
47	Ser	1.18	0.62	1.07	1.31	1.01	0.85	0.99	0.57E-04	01
48	Ala	1.16	0.73	1.01	1.54*	1.10?	0.73	0.83	0.82E-04	01
49	Glu	1.17	0.79	1.00	1.40	0.99	0.80	0.80	0.40E-04	01
50	Asp	1.04	0.93	1.05	1.11	0.96	0.95	0.76	0.11E-04	01
51	Cys	0.99	1.09	0.93	0.76	0.93	1.03	0.93	0.96E-04	10
52	Met	0.99	1.09	0.93	0.82	1.06	1.19*	0.94	0.60E-04	10
53	Arg	0.77	1.02	1.17	0.77	1.23	1.03	1.06	0.13E-03*	10
54	Thr	0.67	0.97	1.32	0.72	1.30*	0.90	1.08	0.16E-03*	11
55	Cys	0.81	0.88	1.24	0.74	1.15	0.77	1.14*	0.14E-03*	11

图 3(E) 片段的数据输出。P_a、P_b、P_t 分别为以该残基为第一个的四肽构象潜能 $\langle P_\alpha \rangle$, $\langle P_\beta \rangle$, $\langle P_t \rangle$; $f_{\alpha N}$、$f_{\alpha C}$、$f_{\beta N}$、$f_{\beta C}$ 分别为与下标对应的 α 螺旋和 β 折叠的N末端和C末端的边界参数。超过一般平均值的以"?"标出，显著超过的大可能性位置以*标出。f_t 为 P_t 值，超过 0.75×10^{-4} 标以?号，超过 0.1×10^{-3} 标以*号。

输出子程序。对有 58 个残基的 Try-Inh，上述的计算和判断只需运行 1.5 分钟。

在 Chou 与 Fasman 方法中，有些区域能形成的构象不是唯一的。对于这种含糊的地方灵活性较大，如加用一些指标来硬算，其结果的可靠性是值得怀疑的。因此本程序将其可能性全部列出，最后的取舍由用户以人工参与的方式解决。结果和数据输出子程序就是为此服务而用来给出 Chou 与 Fasman 方法所能得到的有用的数据。数据输出菜单如

图 2(B) 所示，具有显示结果，图表、数据、参数表列、手工预测表等几种方式可供选择，输出界线选择使程序只打印所限区间内的各种数据。 Try-Inh 的预测结果和数据见图 3(A)—(E)。

结果显示可能有四段 α 螺旋，三段 β 折叠和七个 β 转角，其中有三个 α 螺旋与 β 折叠的重叠区。通过图 3(A) 的构象潜能值比较可以排除 14—20 和 22—34 的 α 螺旋，图 3(B) 的 $\langle P_\alpha \rangle \langle P_\beta \rangle$ 曲线上的两个 β 折叠大峰也支持应存在 18—24 和 29—35 的 β 折叠。由图 3(B) 的 $\langle P_\alpha \rangle$，$\langle P_\beta \rangle$ 曲线上 45—53 的 α 螺旋峰比 51—55 的 β 折叠峰大以及螺旋一般较 β 折叠长的原则可以排除 51—55 的 β 折叠。图 3(E) 中 48—54 的 α 螺旋的很大边界可能性也支持 45—53 的 α 螺旋。这样得到的最后结果见图 4。

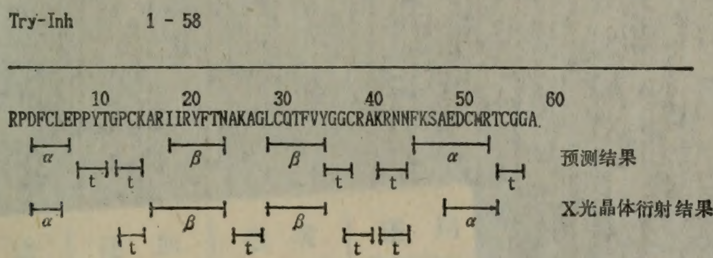


图 4 最后预测结果与 X 光晶体衍射的结果比较

通过图 4 的预测结果与 X 光晶体衍射测定的 Try-Inh 的立体结构比较，α 螺旋少预测一个残基，多预测四个残基，预测准确率为 91%；β 折叠少预测两个残基，预测准确率为 94%；β 转角多预测十个残基，少预测六个残基，预测准确率为 68%。

注：如有需用本程序者，请带磁盘来本实验室拷贝。我们将免费提供。

中科院植物所图书馆
S0011916

分类期 89.6.15.
来 源 西单新
书 价 5.20
单据号 143492
入藏日期 89.6.15.

24916 58.1742
777
蛋白质和酶学研究方法
第一册 1989.

借 者	还 期	借 者	还 期

58.1742
777
注 意 24916

1 借书到期请即送还。
2 请勿在书上批改圈点，折角。
3 借去图书如有污损遗失等情形须照章赔偿。

京卡0701

ISBN 7-03-000885-
Q·140

定　价：5.20
科技新书目：190-
58
7